Genetische und biochemische Untersuchungen über die Initiationsfaktoren der Proteinbiosynthese

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Martin Brombach
aus Rheine
(1987)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0013

Genetische und biochemische Untersuchungen über die Initiationsfaktoren der Proteinbiosynthese

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Martin Brombach
aus Rheine
(1987)

Tag der mündlichen Prüfung:	9.7.1987
Dekan:	Prof. Dr. W. Engels
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. V. Braun
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. K.-G. Hantke

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	**EINLEITUNG**	6
1.1	Mechanismus der Initiationskomplexbildung	10
1.2	Strukturelle und funktionelle Aspekte der Komponenten bei der Initiationskomplexbildung	12
1.3	Regulation der Gene für die Initiationsfaktoren	20
1.4	Aufgabenstellung	22
2	**MATERIAL UND METHODEN**	25
2.1	Chemikalien	25
2.2	Radiochemikalien (Isotope)	26
2.3	Enzyme	26
2.4	Verschiedenes	27
2.5	Geräte	28
2.6	Allgemeine Methoden	29
2.6.1	Verwendete Medien	29
2.6.2	Verwendete Bakterienstämme	29
2.6.3	Stammlösungen für Medienzusätze	30
2.6.4	Behandlung von Materialien für die Arbeiten mit DNA und RNA	31
2.6.5	Radioaktivitätsmessungen	31
2.6.6	Autoradiographie	31
2.6.7	Präzipitationen aus Lösungen	32
2.6.8	Anzucht, Wachstum und Lagerung von Bakterienstämmen	32
2.6.8.1	Sterilisation von Glasgeräten und Lösungen	32
2.6.8.2	Lagerung von Bakterienstämmen	32
2.6.8.3	Wachstum von Bakterien	33
2.6.8.4	Bakterienkulturen für die Isolierung von Plasmiden	33
2.6.8.5	Anzucht von M13 Phagen in Bakterienstämmen	33
2.6.8.6	Induktion von Bakterienstämmen mit hitzelabilem cI857 Lambda Repressor	34
2.6.9	Transformation von Bakterienstämmen mit Plasmiden oder M13 RF-DNA	34

		Seite
2.6.10	Ligationen	35
2.6.11	Isolierung von Plasmid-DNA und M13 RF-DNA	35
2.6.12	Isolierung von M13 Einzelstrang-DNA (ss-DNA)	36
2.6.13	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	36
2.6.14	Isolierung von chromosomaler DNA	36
2.6.15	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	36
2.6.16	Bestimmung der Kopienzahl von Plasmiden	37
2.6.17	Umwandlung von 5' hervorstehenden DNA-Enden in stumpfe ("blunt") Enden	37
2.6.18	Markierung von DNA-Fragmenten mit radioaktiven Deoxynukleotidtriphosphaten	38
2.7	RNA-"dot-blot"-Hybridisierung auf Nitrozellulosefilter	38
2.7.1	Extraktion von gesamter zellulärer RNA	38
2.7.2	Bindung von RNA an Nitrozellulosefilter	39
2.8	Hybridisierungsbedingungen	39
2.8.1	Heterologe DNA-DNA-Hybridisierung auf Nitrozellulosefiltern	39
2.8.2	Hybridisierung von an Nitrozellulose gebundener RNA mit radioativ markierter DNA	39
2.9	Elektrophoretische Methoden	40
2.9.1	Auftrennung von DNA-Fragmenten	40
2.9.2	Auftrennung von Proteinen	41
2.9.2.1	SDS-Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese (PAGE)	41
2.9.2.2	Zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese	41
2.9.3	DNA-Sequenzierungsgele	42
2.10	DNA-Sequenzierung mit der Dideoxy-Kettenabbruch ("chain-terminating") Methode	42
2.10.1	Herstellung der Sequenzierungsmischungen	42
2.10.2	Sequenzierungsreaktion	44
2.10.3	Auswertung der Autoradiogramme von DNA-Sequenzierungsgelen	45
2.11	Synthese von Oligodeoxyribonukleotiden	45
2.11.1	Syntheseprinzip und Chemie	45

Seite

2.11.2 Manueller Synthesezyklus 46
2.11.2.1 Veresterung freier 5'-Hydroxylgruppen ("capping-Reaktion") 46
2.11.2.2 Detritylierungsreaktion 47
2.11.2.3 Kondensationsreaktion 47
2.11.2.4 Oxidationsreaktion 47
2.11.2.5 Abschluß des Synthesezyklus bzw. vorzeitige Beendigung 48
2.11.3 Abspaltung der Schutzgruppen und Freisetzung der Oligodeoxyribonukleotide 48
2.11.4 Umwandlung der Phosphotriester-Bindungen in Phosphodiester-Verknüpfungen 48
2.11.5 Abspaltung der Basenschutzgruppen und Freisetzung der Deoxyoligoribonukleotide vom Trägermaterial 49
2.12 Reinigung von Oligoribonukleotiden 49
2.12.1 Auftrennung auf PAA-Harnstoff Gelen 49
2.12.2 Reinigung von Oligonukleotiden durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) 50
2.12.3 Kontrolle der Reinheit von Oligodeoxyribonukleotiden 51
2.13 Stellenspezifische Mutagenese ("site-directed mutagenesis") mit Deoxyoligoribonukleotiden 51
2.14 Nachweis der Initiationsfaktoren 52
2.14.1 Analyse in SDS-PAA-Gelen 52
2.14.2 Quantitative Aktivitätsbestimmung der Initiationsfaktoren 53

3 **ERGEBNISSE** 55

3.1 Identifizierung, Klonierung und Sequenzierung des Gens für IF2 aus B. stearothermophilus 55
3.1.1 Isolierung der DNA-Fragmente für die Kreuzhybridisierung 55

Seite

3.1.2 Identifizierung von kreuzhybridisierenden DNA-Fragmenten aus chromosomaler DNA von B. stearothermophilus 55

3.1.3 Klonierung und Identifizierung des ~6 kb HindIII DNA-Fragmentes 58

3.1.4 Subklonierung und DNA-Sequenzierung des ~2.2 kb HindIII-SphI-Fragmentes 61

3.1.5 Identifizierung des 5'-terminalen DNA-Fragmentes mit dem Translationsstart für BstIF2 ("chromosome walking") 65

3.1.6 Expression des BstIF2-Proteins in E. coli Zellen 67

3.1.7 Nachweis der biologischen Aktivität von BstIF2 aus E. coli Zellen 70

3.1.8 Vergleich der Aminosäuresequenzen und der Gene für BstIF2 und EcoIF2 71

3.2 Untersuchungen zur Expression und Regulation des infC Gens aus Escherichia coli 76

3.2.1 Subklonierung von infC in pPLc2833 76

3.2.2 Expression von infC im induzierbaren System 80

3.2.3 Stellenspezifische Mutagenese der DNA-Region mit dem ATT-Startkodon des infC Gens 82

3.2.4 Überproduktion von IF3 in Stämmen mit mutierter Region des Startkodons von infC 83

3.2.5 Bestimmung der Kopienzahl von Plasmiden mit infC Gen 88

3.2.6 Bestimmung der infC-spezifischen mRNA mit RNA-"dot-blot"-Hybridisierung 90

3.2.7 Bestimmung der IF3-Aktivität in Stämmen mit Plasmiden mit erhöhter infC Expression 95

4 DISKUSSION 99

4.1 Primärsequenz der IF2-Proteine und Sequenzhomologien für die DNA-Kreuzhybridisierung 99

Seite

4.2 Festlegung des Proteinstarts für BstIF2 und Expression des Gens 101
4.3 Vergleichende Analyse der Sequenzdaten 105
4.4 Verwendung des Triplettkodes in B. stearothermophilus 108
4.5 Expression von infC in Stämmen mit zusätzlichen extrachromosomalen Kopien des Gens auf Plasmiden 111
4.6 Transkriptionseinheit und Regulation des infC Gens 115

5 ZUSAMMENFASSUNG 121

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 122

LITERATURVERZEICHNIS 124

1. Einleitung

Ein elementarer Vorgang in jeder lebenden Zelle ist die Umsetzung (Expression) der in den Nukleinsäuren (DNA) vorhandenen Information in zelluläre Strukturen. Dieser Vorgang, die Expression von Genen, ist am besten in dem Gram-negativen Enterobakterium Escherichia coli untersucht und verstanden; er läuft im wesentlichen in zwei Stufen ab:

I) Transkription

In der ersten Stufe, der Transkription, wird die primäre genetische Information der DNA durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase in RNA-Moleküle umgeschrieben (transkribiert), wobei grundsätzlich zwei Klassen von Transkripten unterschieden werden können:

a) RNA-Moleküle, die nach weiterer Modifikation (Prozessierung) eine definierte Tertiärstruktur (Konformation) in der Zelle einnehmen und entweder eine Funktion als Strukturkomponenten (z.B. ribosomale RNAs (rRNAs)) übernehmen oder als Überträger von aktivierten Aminosäureresten (tRNAs) dienen.

b) RNA-Moleküle, deren Basenabfolge als Vorlage ("template") für die Umsetzung der Information in Proteine dient (Boten-RNA oder mRNA).

II) Translation

In der zweiten Stufe, der Translation, wird die in der Sequenzabfolge der mRNAs festgelegte Information in Proteine übersetzt (translatiert). Dieser Translationsvorgang erfordert das koordinierte Zusammenwirken von den bereits erwähnten RNA-Molekülen mit bestimmten Proteinen und findet an zellulären Komplexen, den Ribosomen, statt.

Am gesamten Translationsvorgang sind insgesamt mehr als 150 makromolekulare Komponenten beteiligt, und alle Kompo-

nenten zusammen wiegen etwa die Hälfte des Trockengewichts von exponentiell wachsenden Bakterienzellen. Da der Prozeß zusätzlich etwa 80% der Energie einer exponentiell wachsenden Zelle verbraucht, wird deutlich, daß das Verständnis des Ablaufs und der Regulation des Translationsvorganges einen entscheidenden Schritt auf dem Weg zum Verständnis molekularer Vorgänge des Zellwachstums bedeutet.

Für das Verständnis des gesamten molekularen Ablaufs der Proteinbiosynthese ist die genaue Kenntnis der Struktur und Funktion der Einzelkomponenten eine wichtige Voraussetzung. Über viele der beteiligten Bestandteile und Teilvorgänge der Proteinbiosynthese sind bereits umfangreiche Einzelergebnisse gewonnen worden, die in einigen Punkten noch kontrovers diskutiert werden.

Bei der Synthese von Proteinen lassen sich drei Teilvorgänge unterscheiden, in denen jeweils das Ribosom (bzw. eine der ribosomalen Untereinheiten) die zentrale Stellung einnimmt, dessen Aktivität jedoch von einer Anzahl löslicher Kompomenten und Proteine abhängt.

Elongation

Der zyklische Prozeß der Kettenverlängerung (Elongation) ist gekennzeichnet durch die energieabhängige Relativbewegung des 70S Ribosomenkomplexes an der mRNA im Dreierraster (Triplettkode). Die Bindung der beladenen tRNA (Aminoacyl-tRNA (AA-tRNA)) erfolgt an die ribosmale A-Stelle, wobei die Bindung durch die Kodon-Antikodon-Wechselwirkung, den Elongationsfaktor (EF)-Tu und eine Wechselwirkung zwischen tRNA und rRNA stabilisiert wird. Die Bindung der AA-tRNA erfolgt als ternärer Komplex (EF-Tu·GTP·AA-tRNA) und erfordert Energie, die durch ribosomen- und EF-Tu-abhängige Hydrolyse von Guanosintriphosphat (GTP) bereitgestellt wird. Es erfolgt eine Konformationsänderung des Ribosoms, während der der EF-Tu·GDP-Komplex das Ribosom verläßt. Auf die

stabil in der A-Stelle gebundene AA-tRNA wird der Peptidyl-Rest der in der P-Stelle gebundenen Peptidyl-tRNA übertragen (Peptidyltransferaseaktivität des Ribosoms). Hierbei wird die neue Peptidbindung geknüpft. Im energieabhängigen Schritt der Verschiebung des Ribosoms um ein Triplett (Translokation) wird nach der Bindung des Elongationsfaktors G (EF-G) die Peptidyl-tRNA unter Hydrolyse von GTP in GDP und Pi und Freisetzung des Faktors in die P-Stelle überführt, wodurch die A-Stelle für einen erneuten Zyklus frei wird. Neuere Untersuchungen weisen ferner eine dritte ribosomale Bindestelle, die E-Stelle, nach.

Termination

Ist in die ribosomale A-Stelle eines der drei Stop-Kodone (UAA, UGA, UAG) vorgerückt, wird im Regelfall der Kettenabbruch (Termination) eingeleitet. Dazu bindet einer der beiden Release-Faktoren (RF) unter spezifischer Erkennung des Stopkodons (RF-1 ist spezifisch für UAA und UGA; RF-2 ist spezifisch für UAA und UAG) an das Ribosom, und das Polypeptid wird durch Hydrolyse der Peptidyl-tRNA im Peptidyltransferasezentrum des Ribosoms freigesetzt. Ein dritter Release-Faktor (RF-3) stimuliert dabei RF-1 und RF-2 und ist vermutlich nach Hydrolyse von GTP an deren Freisetzung vom Ribosom beteiligt. Für die Freisetzung der Deacyl-tRNA und der mRNA bindet danach der Ribosomen-Release-Faktor (RRF) an das Ribosom, der die 70S Ribosomen zusammen mit den Komponenten verläßt. Der 70S-Komplex steht in Abhängigkeit von der Mg^{2+}-Konzentration im Gleichgewicht mit den dissoziierten 30S und 50S Untereinheiten, die für den im folgenden beschriebenen Start der Proteinsynthese getrennt vorliegen sollten.

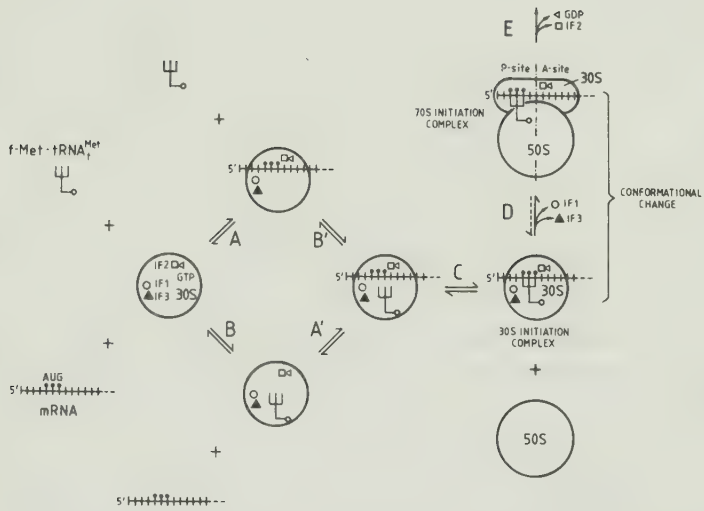

Abb.1 Schematische Darstellung des Initiationsvorgangs (nach Gualerzi et al., 1986) (vgl. Text).

Initiation

Der entscheidende und möglicherweise limitierende Schritt der Proteinbiosynthese in einer Bakterienzelle ist der Kettenstart (Initiation), da er die Voraussetzungen für den geregelten Ablauf der beiden zuvor beschriebenen Vorgänge schafft. Der Initiationsschritt beinhaltet zwei wichtige Funktionen:

1) Eine Translationseinheit (Cistron) auf der mRNA wird erkannt und für die Translation ausgewählt.
2) Das Leseraster wird festgelegt, und das Ribosom wird in die Phase des richtigen Leseraster gebracht.

Für den Ablauf dieser Funktionen müssen die folgenden

Komponenten koordiniert und kinetisch beim Initiationsprozeß zusammenwirken:

- mRNA
- Initiator-tRNA ($fMet-tRNA_f^{Met}$)(fMet-tRNA)
- 30S ribosomale Untereinheit
- 50S ribosomale Untereinheit
- GTP
- Initiationsfaktoren (IF) (IF1, IF2, IF3).

1.1 Mechanismus der Initiationskomplexbildung

Die Reaktionsfolge, nach der alle oben genannten Komponenten zusammenwirken, kann dabei, wie in Abb.1 dargestellt, im wesentlichen in zwei Teilschritte untergliedert werden:

- Im ersten Schritt erfolgt die Bildung eines 30S Initiationskomplexes (30S·[IF1,IF2·GTP,IF3]·fMet-tRNA·mRNA).
- Im zweiten Schritt bindet die 50S ribosomale Untereinheit, und es bildet sich der 70S Initiationskomplex unter Freisetzung der Initiationsfaktoren und Hydrolyse von GTP (vgl. Abb.1).

Wie zuvor erwähnt, schließt sich der Initiationsvorgang, der in exponentiell wachsenden Bakterienzellen eng mit der Transkription gekoppelt ist, unmittelbar an die Freisetzung der 70S Ribosomen bei der Termination an. Die 70S Ribosomen stehen danach im dynamischen Gleicgewicht mit ihren 30S und 50S Untereinheiten:

$$70S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} 30S + 50S$$

Da IF3 an 30S Untereinheiten bindet und er die Reassoziationsrate (k_{-1}) reduziert, wirkt er somit als eine Art Antiassoziationsfaktor. IF1 bindet an 30S Untereinheiten und erhöht sowohl k_1 wie auch k_{-1}. IF2 wird als Komplex mit GTP an 30S Untereinheiten gebunden, und die Bindung aller drei

Faktoren an die 30S Untereinheit wird kooperativ verstärkt. Dabei ist die Reihenfolge der Bindung der Faktoren nicht bestimmt; es scheint jedoch gesichert, daß in Zellen freie 30S Untereinheiten mit allen 3 Faktoren und GTP gesättigt vorliegen (vgl. Abb.1).

Zur Bildung des 30S Initiationskomplexes ist im weiteren die Bindung der Initiator-tRNA (fMet-tRNA) und der mRNA an den Komplex erforderlich. Von einigen Autoren wurden bei Bindungsstudien mit nicht kompletten Initiationssystemen Hinweise gefunden, daß IF2 im Komplex mit fMet-tRNA bindet. Weiterhin wurde gefunden, daß die Reihenfolge der Bindung von fMet-tRNA und mRNA festgelegt und bestimmbar ist (Übersicht bei Hershey, 1987). Im Gegensatz dazu stehen neuere kinetische Untersuchungen mit in vitro Initiationssystemen, die den in Abb.1 dargestellten Mechanismus unterstützen (Übersicht bei Gualerzi et al., 1986).

Danach erfolgt die Bildung des 30S Initiationskomplexes über zwei binäre Komplexe (30S-fMet-tRNA und 30S-mRNA), wobei die Bildung beider Komplexe gleich wahrscheinlich ist (d.h. die Reaktionsfolge der Reaktionen AB' oder BA' in Abb.1 ist nicht voneinander unterscheidbar). Beide binären Komplexe stehen miteinander in schnell austauschbaren Gleichgewicht, und als eine Art Zwischenstufe bildet sich der präternäre Komplex (30S-fMet-tRNA-mRNA). In einer ein- oder zweistufigen Umlagerungsreaktion und/oder Konformationsänderung geht aus dem präternären Komplex der 30S Initiationskomplex hervor (Reaktion C in Abb.1). Diese Reaktion ist geschwindigkeitsbestimmend für die gesamte Bildung des 30S Initiationskomplexes (Einzelheiten zu kinetischen Daten bei Gualerzi et al., 1986). Der stabile 30S Initiationskomplex dient in vitro als Hauptnachweisreaktion für die Analyse der Initiationskomplexbildung, da sich im Komplex gebundene radioaktive Komponenten (z.B. radioaktiv markierte fMet-tRNA oder mRNA) von nicht gebundenen trennen lassen (Filtration des Komplexes auf Nitrozellulose oder Trennung des Komplexes auf Saccharosedichtegradienten).

Zur Bildung des 70S Initiationskomplexes bindet die 50S ribosomale Untereinheit an den 30S Initiationskomplex, und spätestens zu diesem Zeitpunkt werden die drei Initiationsfaktoren freigesetzt und GTP wird hydrolysiert. Die fMet-tRNA befindet sich in der P-Stelle der 50S ribosomalen Untereinheit, und der 70S Komplex tritt in den Elongationszyklus ein. Wie auch bei der 30S Initiationskomplexbildung läßt sich die 70S Initiationskomplexbildung in in vitro Experimenten in mehrere Teilreaktionen auflösen, die zu einer irreversiblen Konformationsänderung des Ribosoms führen (vgl. Abb.1) (Einzelheiten bei Hershey, 1987). Zu diesem Zeitpunkt ist mit der 70S Initiationskomplexbildung und der Positionierung der fMet-tRNA in der P-Stelle die Auswahl eines Cistrons auf der mRNA und die Positionierung des Ribosoms im Leseraster bereits abgeschlossen, da der 70S Komplex in der Lage ist, in den Elongationszylus einzutreten. Im folgenden soll daher anhand einer kurzen Übersicht über die Funktion und Struktur der an der Initiation beteiligten Komponenten zusammengefaßt werden, welche Erkenntnisse über den Ablauf des Auswahlvorgangs eines Cistrons vorliegen. Dabei soll auch dargelegt werden, welche Faktoren festlegen, in welcher Menge ein bestimmtes Protein erzeugt wird bzw. wodurch die Translationseffienz eines Cistrons bestimmt wird.

1.2 Strukturelle und funktionelle Aspekte der Komponenten bei der Initiationskomplexbildung

Neben den Funktionsanalysen der Komponenten mit in vitro Testsystemen ist die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der makromolekularen Komponenten für Zuordnung von Funktionen zu Strukturkomponenten (z.B. Domänen der Proteine bzw. Einzelproteine der Proteinkomplexe) ein wichtiger Schritt zum Gesamtverständnis der Vorgänge bei der Initiation. Die direkte Strukturaufklärung mit Methoden der Röntt-

genstrukturanalyse hat bisher bei der fMet-tRNA aus E. coli (Woo et al., 1980) zum Erfolg geführt, und erste Ergebnisse mit dieser Methode wurden bei ribosomalen Untereinheiten erzielt (Yonath et al., 1986a). Da diese Methode der Strukturaufklärung die Kristallisation der Komponenten voraussetzt, die aus verschiedensten Gründen nicht immer möglich ist, muß die Aufklärung der Struktur der anderen Komponenten in Zukunft noch mit Methoden erfolgen, die bereits zu den folgenden Ergebnissen geführt haben.

Ribosomale Untereinheiten

Die Bedeutung der ribosomalen Untereinheiten für die gesamte Translation wurde bereits anfangs aufgezeigt. Da für die Auswahl eines Cistron bei der Initiation nur die Struktur der 30S ribosomalen Untereinheit von Bedeutung ist, sollen hier nur Ergebnisse über die Festlegung der Initiationsregion auf dieser Untereinheit zusammengefaßt werden. Eine ausführliche Zusammenfassung der Erkenntnisse über die Gesamtstruktur des Ribosoms zur Zuordnung der Begriffe kann der Literatur entnommen werden (Wittmann, 1982; Wittmann, 1983).

Mit Methoden der direkten Quervernetzung der Initiationsfaktoren untereinander und der Faktoren mit ribosomalen Proteinen (Boileau et al., 1983) wurde gezeigt, daß diese unterhalb des Kopfes ("head") nahe der zentralen Einfurchung ("cleft") zwischen Kopf und Zentralkörper ("body") der 30S ribosomalen Untereinheit binden, in einer Region, in der auch die ribosomalen Proteine S1 und S21 lokalisiert wurden (Hershey, 1987). Nahe der Einfurchung wurde auch das 3'-Ende der 16S rRNA lokalisiert, dessen Funktion bei der mRNA Bindung noch erläutert wird. Bei Bindung an die 30S ribosomale Untereinheit wurde IF2 jeweils mit IF1 und IF3 quervernetzt gefunden, nicht jedoch IF1 mit IF3, was auf eine Bindung von IF1 und IF3 zu beiden Seiten von IF2 hindeutet. Weiterhin wurde gezeigt, daß der Bereich der Kodon-Antikodon Wechsel-

wirkung - also auch der Bereich der direkten Bindung des Antikodons der fMet-tRNA an das Startkodon der mRNA - innerhalb der Einfurchung liegt (Hershey, 1987).

Initiator-tRNA (fMet-tRNA)

Die Startkodone der mRNAs (siehe unten) aller Proteine in E. coli werden von der fMet-$tRNA_f^{Met}$ erkannt. Das Antikodon der fMet-tRNA (CAU) ist zwar identisch mit dem der tRNA, die AUG-Kodone innerhalb der Proteine erkennt, jedoch unterscheiden sich beide tRNAs in ihrer Sequenz voneinander. Daher wird nur die $Met-tRNA_f$ von der Transformylase erkannt, welche die in E. coli für die Aktivität notwendige Formylierung der Initiator-tRNA durchführt.

Aus der bekannten Tertiärstruktur der Initiator-tRNA (Woo et al., 1980) wurde abgeleitet, daß die ungewöhnliche Struktur des Antikodon die Bindung der Initiator-tRNA in die ribosomale P-Stelle und damit die Positionierung des 70S ribosomalen Komplexes auf der mRNA determiniert. Die ungewöhnliche Struktur wie auch der 5' zum Antikodon gelegene unmodifizierte Adenosylrest (in anderen tRNAs hypermethyliert) könnten außerdem die Erkennung von unüblichen Startkodonen ermöglichen. Unter Verwendung von N-Ac-Phe-tRNA Derivaten als Initiator-tRNAs gelang es, die Lage der tRNA-Bindestelle durch Quervernetzungen mit 30S ribosomalen Proteinen des Kopfes und der Einfurchung der Untereinheit (Girshovich et al., 1974) zu bestimmen. Die Bindung der fMet-tRNA an 30S Untereinheiten wird stark durch den Initiationsfaktor 2 stimuliert (siehe unten).

mRNA

Die mRNA ist die heterogenste Komponente der Initiation, da sich bei verschiedenen mRNAs sowohl Sequenz und Struktur der Strukturgene als auch die anderen Bereiche der mRNAs stark voneinander unterscheiden. Neben Einflüssen der Sekun-

därstruktur in der Initiationsregion auf die Translationseffizienz (Inserentant und Fiers, 1980) wurde vorwiegend untersucht, wie die Primärsequenz der mRNA mit der Translationseffizienz korreliert werden kann (Übersicht bei Gold et al., 1981 und Kozak, 1983). Als Initiationregion auf der mRNA im engeren Sinne wurde dabei der Bereich der mRNA betrachtet, der in 70S Initiationskomplexen vor Verdau durch Ribonukleasen geschützt ist. Diese aus 70S Initiationskomplexen unter bestimmten Bedingungen isolierten Fragmente der mRNA erstreckten sich von etwa 17 Basen 5'-terminal bis etwa 12 Basen 3'-terminal des Startkodon (AUG), und dieser Bereich wird seither auch als ribosomale Bindestelle (RBS) bezeichnet (Steitz, 1969).

Bei in vitro Experimenten wurde zuvor gefunden, daß die Translationseffizienz synthetischer mRNAs erhöht ist, wenn ein zum Antikodon der Initiator-tRNA voll komplementäres Startkodon (AUG) vorhanden ist (Thatch et al., 1966). Weiterhin wurde bei Vergleichen verschiedener bekannter ribosomaler Bindestellen eine purinreiche Sequenz 5'-terminal des Startkodon entdeckt, die komplementär zum 3'-Ende der 16S rRNA der 30S ribosomalen Untereinheit ist. Für diese Sequenz, die nach ihren Entdeckern allgemein als Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz) bezeichnet wird, wurde postuliert, daß sie die Bindung der mRNA an die 30S ribosomale Untereinheit über Wasserstoffbrückenbindungen mit der komplementären Sequenz der 16S rRNA ("Anti-SD-Sequenz") fördert.

Es konnte gezeigt werden, daß die SD-Wechselwirkung bei der Bindung der mRNA tatsächlich stattfindet, da zum einen der Komplex beider RNAs aus Initiationskomplexen isoliert wurde (Steitz und Jakes, 1975) und zum anderen Mutationen der SD-Sequenz beschrieben wurden, bei denen die Anzahl der komplementären Basen reduziert war und hierdurch die Translationseffizienz der mRNA stark herabgesetzt wurde (Dunn et al., 1978).

Durch verschiedene spezifische Veränderungen der Anti-SD-

Sequenz der 16S rRNA (Übersicht bei Dahlberg, 1986) und mit der Erzeugung von Ribosomen mit synthetischen Anti-SD-Sequenzen (de Boer et al., 1985) konnte weiterhin gezeigt werden, daß mRNAs, die eine größere Anzahl an komplementären Basen zur veränderten Anti-SD-Sequenz dieser Ribosom aufweisen, auch in vivo mit erhöhter Effizienz translatiert werden.

Zusätzlich zu den Untersuchungen der Initiationstripletts und der SD-Sequenzen auf der mRNA wurde bei der Analyse von Mutanten und der statistischen Auswertung von bekannten Initiationsregionen auf mRNAs gefunden, daß eine Bevorzugung von bestimmten Basen in einzelnen Positionen der Initiationsregion besteht (Übersicht bei Gold et al., 1981 und Kozak, 1983). Obwohl eine Abhängigkeit von Unterschieden in der Basenverteilung und der Translationseffizienz der mRNAs festgestellt wurde, konnte diese nicht mit den zuvor beschriebenen RNA-RNA Wechselwirkungen am Ribosom erklärt werden. Da zudem auch gefunden wurde, daß mRNAs ohne SD-Sequenz (z.B. Lambda c_I Repressor) translatiert wurden, gibt es Hinweise dafür, daß die Bindung und Auswahl der mRNAs für die Translation auch von anderen Faktoren (z.B. den Initiationsfaktoren) beeinflußt und stabilisiert werden. Die Translationseffizienz eines Cistrons ergibt sich somit aus der Kombination der verschiedenen Strukturmerkmale der mRNA und der Wechselwirkung der mRNA mit den Komponenten des Initiationskomplexes.

Die folgende kurze Zusammenfassung der Erkenntnisse über die Struktur und Funktion der Initiationsfaktoren soll daher verdeutlichen, welchen Einfluß die Initiationsfaktoren auf die Auswahl und Bindung der mRNA haben.

Initiationsfaktor 1

Der Initiationsfaktor 1 (IF1) ist mit einem Molekulargewicht von M_r = 8119 der kleinste Initiationsfaktor. Die Aufklärung der Tertiärstruktur mit Methoden der Röntgenstruk-

turanalyse ist bisher nicht gelungen, und daher wurde die Strukturaufklärung vorwiegend mit der Methode der ^{1}H-NMR-Spektroskopie durchgeführt, die bei der geringen Größe des Proteins und der bekannten Primärsequenz (Pon et al., 1979) eine Aufklärung der gesamten Struktur ermöglicht. Mit dieser Methode ist es bereits gelungen, alle aromatischen Aminosäurereste des Proteins im NMR-Spektrum zuzuordnen sowie spezifische Veränderungen im Protein bei der Bindung an die 30S ribosomale Untereinheit nachzuweisen (Übersicht bei Gualerzi et al., 1986).

Obwohl IF1 spezifische Wechselwirkungen mit der 30S ribosomalen Untereinheit zeigt, konnte ein direkter Einfluß weder auf die Bindung der mRNA noch auf die Bindung der Initiatior-tRNA an 30S Untereinheiten nachgewiesen werden (Pon und Gualerzi, 1984). So ist als Hauptfunktion von IF1 eine Stimulierung der Aktivitäten von IF3 und IF2 nachgewiesen, die den bereits beim Mechanismus der Initiationskomplexbildung erwähnten Effekt auf die Bildungsrate des ternären Komplexes verursacht. Bisher konnte ein IF1 homologes Protein in Gram-positiven Bakterien nicht nachgewiesen werden (Kay et al., 1976). Dies deutet daraufhin, daß die Funktion von IF1 in Enterobakterien entweder speziesspezifisch ist oder sie von anderen Komponenten des Initiationskomplexes (z.B. ribosomalen Proteinen; Kay et al., 1976) übernommen werden könnte.

Initiationsfaktor 2

Der Initiationsfaktor 2 (IF2) wird aus E. coli Zellen in zwei Formem isoliert. Die als IF2α (M_r = 97300) und IF2β (M_r = 79700) bezeichneten Formen werden von demselben Gen (infB) mit zwei verschiedenen Translationsstarts kodiert (Sacerdot et al., 1984), das bei 68.5 Min. auf der E. coli Chromosomenkarte lokalisiert ist. Beide Faktoren unterscheiden sich nicht essentiell in ihren in vitro Aktivitäten bei Teilreaktionen der Initiationskomplexbildung und in

ihrem Einfluß auf die Transkriptionsaktivität der DNA-Polymerase (Travers et al., 1980). Die Notwendigkeit für die Existenz von zwei Formen von IF2 in Enterobakterien ist daher noch ungeklärt.

IF2 bindet GTP und wirkt wie die Elogationsfaktoren EF-Tu und EF-G als ribosomenabhängige GTPase. Der Vergleich der Proteinhomologien zwischen den drei Faktoren (Sacerdot et al., 1984; March und Inouye, 1985) führte dabei zur Identifizierung der wahrscheinlichen GTP- bzw. GDP-Bindestelle, die in ihrer Struktur auch bei anderen GDP-bindenden Proteinen konserviert ist (Jurnak, 1985). Die Hydrolyse von GTP ist notwendig für die Freisetzung von IF2 vom 70S ribosomalen Komplex und erfolgt nur, wenn vollständige 50S ribosomale Untereinheiten mit den ribosomalen Proteinen L7/L12 binden. Beide Proteine konnten mit IF2 in 70S Komplexen quervernetzt werden (Hershey, 1987). Neben der komplexen Wechselwirkung von IF2 mit GTP und GDP (Pon et al., 1985) fördert der IF2-GTP-Komplex insbesondere die Bindung der Initiator-tRNA an das Startkodon in 30S ribosomalen Initiationskomplexen. Wie bereits zuvor erwähnt, zeigten neuere kinetische Untersuchungen, daß dieser Effekt durch vorherige Bindung des IF2-GTP-Komplexes an der 30S ribosomalen Untereinheit vermittelt wird (Canonaco et al., 1986). Dies wurde insbesondere mit fluoreszenzmarkierten tRNA-Derivaten gezeigt, deren Bindung an 30S Initiationskomplexe stimuliert wird, obwohl diese mit IF2 allein keine binären Komplexe bilden (Gualerzi et al., 1986).

Obwohl die Wirkungsweise von IF2 gut untersucht ist, gibt es bisher mit Ausnahme der GTP-Bindestelle nur wenige Hinweise darauf, welche Bereiche des Proteins an der Bindung an Ribosomen und an der Wechselwirkung mit der Initiator-tRNA beteiligt sind. Aus der bekannten Primärstruktur des Proteins in E. coli wurden Vorhersagen der Sekundärstruktur abgeleitet, die eine strukturelle Zweiteilung des Moleküls in ein N-terminales Drittel und die C-terminalen Zweidrittel nahelegen. Der Grund für diese strukturelle Trennung sowie

für das Vorkommen von zwei Formen von IF2 in Enterobakterien (Howe und Hershey, 1984) sind bisher nicht geklärt, da die vollständige dreidimensionale Struktur des Proteins noch nicht aufgeklärt ist.

Initiationsfaktor 3

Der Initiationsfaktor 3 (IF3) ist wie IF1 ein relativ kleines basisches Protein (M_r = 20668) mit bekannter Primärsequenz (Brauer und Wittmann-Liebold, 1977; Sacerdot et al., 1982), dessen Gen (infC) bei 35 Min. auf der E. coli Chromosomenkarte kartiert wurde.

Die Aufklärung der Wirkungsweise und Struktur dieses Faktors ist von besonderem Interesse, da er neben seiner Wirkung auf die Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten (vgl. 1.1) für die effiziente Translation einiger natürlicher mRNA essentiell ist und deren Bindung an 30S ribosomale Untereinheiten fördert (Gualerzi et al., 1986).

Nach Hinweisen auf direkte Wechselwirkungen von IF3 mit RNAs (Wikstrom, 1974; Wikstrom, 1981; Schleich et al., 1980) wurde angenommen, daß IF3 über direkte Wechselwirkungen mit mRNAs die Translationseffizienz von mRNAs beeinflußt.

Durch die Verbindung von Untersuchungen über den Faktor mit Methoden der chemischen Modifikation und der Analyse der Struktur des Faktors und der Bindung an die 30S ribosomale Untereinheit mit der ^{1}H-NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, daß eine primäre Bindung über die Wechselwirkung mit der 16S rRNA erfolgt (Gualerzi et al., 1986). Es wurden für die Bindung und die Aktivität von IF3 wichtige Aminosäurereste im Protein identifiziert, die es ermöglichten, Aussagen über die Struktur des Protein zu machen (Einzelheiten bei Gualerzi et al., 1986).

Aus den kinetischen Daten und den Ergebnissen aus den Struktur- und Funktionsuntersuchungen wurde ein Modell für die Wirkungsweise von IF3 an 30S Untereinheiten entwickelt (Pon et al., 1982). Bei der Bindung an 30S Untereinheiten,

die über Wechselwirkungen mit der 16S rRNA erfolgt, verändert der Faktor die Konformation der Untereinheit. Dies führt insbesondere zu veränderten Eigenschaften des Komplexes für die Bindung von natürlichen mRNAs. Ob IF3 dabei an der Oberfläche der Untereinheit dennoch direkt auch mit mRNAs in Wechselwirkung tritt, ist nicht völlig auszuschließen.

Ebenfalls nicht vollständig geklärt ist, zu welchem Zeitpunkt IF3 den ternären Komplex verläßt. Unter bestimmten Bindungen konnte nachgewiesen werden (van der Hofstad et al., 1978), daß die Bindung von IF3 an den 30S Komplex IF2 und fMet-tRNA freisetzt. Hieraus wurde geschlossen, daß sich die Bindung von IF3 und IF2/fMet-tRNA an den ternären Komplex ausschließen und IF3 vor der Bindung der 50S Untereinheit freigesetzt wird.

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, daß eine Freisetzung von IF3 bei Zugabe von verschiedenen Kombinationen von IF2, fMet-tRNA und mRNA zum 30S-IF3-Komplex nicht nachzuweisen ist, während diese erfolgt sobald 50S ribosomale Untereinheiten zugegeben werden (Gualerzi et al., 1986). Diese Ergebnisse zusammen mit kinetischen Daten über die Bindung von IF2 an 30S Untereinheiten unterstützen die Freisetzung von IF3 (und IF1) (vgl. Abb.1, D) bei der Bindung der 50S ribosomalen Untereinheit an den ternären Komplex.

1.3 Regulation der Initiationsfaktorgene

Bei Untersuchungen der Menge der Initiationsfaktoren in *E. coli* über den gesamten Bereich der Wachstumsphase wurde ermittelt, daß Zellen wachstumsabhängig ein konstantes Verhältnis von Initiationsfaktoren zu Ribosomen von 0.15-0.20 Moleküle pro Ribosom für alle drei Initiationsfaktoren enthalten (Pon und Gualerzi, 1979; Howe und Hershey, 1981). Mit der Identifizierung und Klonierung der Gene für IF2 (*infB*) (Plumbridge et al., 1982; Ishii et al., 1984) und IF3

(infC) (Springer et al., 1977b) wurden die Voraussetzungen zur Untersuchung der Regulation geschaffen.

Da beide Gene in Regionen mit Genen anderer an der Translation beteiligter Komponenten lagen (i.e. tRNA-Synthetasen und ribosomale Proteine; Übersicht bei Grunberg-Manago et al., 1984), wurde eine Autoregulation der Gene vermutet, wie sie bei ribosomalen Proteinen gefunden wurde (Übersicht bei Lindahl und Zengel, 1986). Dieser Mechanismus der Regulation wurde jedoch ausgeschlossen, da Ergebnisse vorlagen, daß die Synthese beider Gene als Folge von Gendosiseffekten bei zusätzlich vorhandenen extrachromosomalen Genkopien stark erhöht ist (Plumbridge et al., 1982; Lestienne et al., 1982). Bei der genaueren Untersuchung des infB-Operons wurden später Hinweise gefunden, daß infB in einer Transkriptionseinheit mit nusA über das NusA-Protein autoreguliert werden könnte (Nakamura et al., 1985).

Bei in vitro Untersuchungen zur Expression des infC Gens wurde gezeigt (Elhardt et al., 1982), daß die Wachstumsregulation des Gens ähnlich wie bei einigen rRNA-Genen über Guanosin-Tetraphosphat (ppGpp) (Übersicht bei Lindahl und Zengel, 1986) erfolgen könnte. In der Folge konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Bestimmung der Transkriptionseinheit des infC Gens, dessen Startkodon nur 3 Basen von 5'-terminal gelegenen Stopkodon des thrS Gens trennen. Hierbei wurde sowohl die Existenz von thrS-infC Transkripten nachgewiesen wie auch Promotoren innerhalb von thrS, die eine von thrS unabhängige Transkription und Translation von IF3 in vivo ermöglichten (Mayaux et al., 1983).

Neuere in vivo und in vitro Untersuchungen haben gezeigt, daß sowohl für die Regulation der Threonyl-tRNA Synthetase als auch für IF3 Hinweise für eine Regulation auf der Ebene der Translation bestehen (Butler et al., 1986a; Butler et al., 1986b).

Ein derartiger Mechanismus der Regulation der infC Expression war zuvor bereits auf der Basis von besonderen Strukturmerkmalen der bekannten Sequenz der infC-mRNA

(Sacerdot et al., 1982) diskutiert worden.

Danach ist die Translation der infC-mRNA aufgrund dieser besonderen Strukturmerkmale (Gold et al., 1984) im Gegensatz zu anderen natürlichen mRNAs (siehe oben) am 30S-Komplex nicht IF3-abhängig. Mit steigender Wachstumsrate oder steigenden Mengen von IF3 konkurriert die infC-mRNA am 30S-Komplex mit anderen mRNAs, die bevorzugt translatiert werden. Hierdurch sinkt die IF3-Konzentration ab, wodurch die Translation der IF3-unabhängigen infC-mRNA bevorzugt wird, und die IF3-Konzentration steigt erneut an.

1.4 Aufgabenstellung

Die vorhergehende kurze Übersicht macht deutlich, daß in bezug auf die Wirkungsweise der an der Initiation beteiligten Komponenten und den Gesamtablauf zahlreiche Punkte nicht geklärt sind.

Mit einer Ausnahme (Springer et al., 1977a) wurden Mutanten, deren Mutation den Initiationsvorgang beeinflußt, trotz zahlreicher Bemühungen nicht gefunden. Daher bieten sich für die Erweiterung des Wissens über den Ablauf der Initiation im wesentlichen folgende Möglichkeiten an:

1) Die vergleichende Untersuchung der Struktur und Funktion von am Initiationsvorgang beteiligten Proteinen bzw. Proteinkomplexen aus anderen Organismen liefert wichtige Informationen über unverzichtbare und daher konservierte Strukturen der Proteine.
2) Die gezielte Herstellung von Stämmen mit veränderten funktionellen Proteinen und die Untersuchung der Struktur und Funktionsweise der veränderten Proteine liefern Hinweise auf ihren molekularen Wirkungsmechanismus.
3) Die Anwendung genetischer Methoden eröffnet die Möglichkeit, in vivo Effekte in Zellen zu untersuchen und Informationen über den Ablauf und die Regulation der Vorgänge zu erhalten, an denen diese Proteine be-

teiligt sind.

Die vorliegende Arbeit besteht aus zwei Teilen. Im ersten Teil wird die Klonierung und Sequenzierung des Gens für Initiationfaktor 2 aus Bacillus stearothermophilus beschrieben. Dieses Gen aus diesem Organismus wurde aus folgenden Gründen ausgewählt und kloniert:

a) Das Gen für den Vergleich der Struktur und Funktion des Proteins aus E. coli war bereits charakterisiert (siehe oben).

b) Es lagen Hinweise vor, daß funktionelle Genprodukte aus diesem Organismus in E. coli Zellen erzeugt werden konnten (Barker, 1982).

c) Bei Expression des Gens in E. coli Zellen bestand die Möglichkeit, auf einfache Weise große Mengen des Proteins in reiner Form zu erhalten, die für die Charakterisierung notwendig waren.

d) Es gab Hinweise, daß IF2 aus B. stearothermophilus von geringerem Molekulargewicht und thermisch stabiler als der Faktor aus E. coli war (Kay et al., 1976) und daß sich Proteine (ribosomale Proteine bzw. vollständige ribosomale Untereinheiten) aus B. stearothermophilus besser zur Erzeugung von Proteinkristallen eigneten (Yonath et al., 1986b und darin zitierte Literatur). Diese Befunde deuteten darauf hin, daß sich IF2 aus B. stearothermophilus für eine Untersuchung der vollständigen dreidimensionalen Struktur mit Methoden der Röntgenstrukturanalyse besser eignen würde.

Der zweite Teil der Arbeit beschreibt die Herstellung von mutierten E. coli Stämmen, die E. coli IF3 in erheblich erhöhten Mengen mit induzierbaren Expressionssystem auf Plasmiden erzeugen. Diese Arbeiten wurden mit folgenden Absichten durchgeführt:

a) Die Subklonierung des Strukturgens für IF3 in einen Expressionsvektor sollte eine definierte Transkrip-

tionseinheit mit gut charakterisiertem Promotor erzeugen, der eine stabile Expression des Proteins ermöglichen sollte.

b) Die Erzeugung einer definierten Transkriptionseinheit sollte Untersuchungen darüber ermöglichen, welche Regulationsmechanismen posttranskriptional die Expression des Gens beeinflußten.

c) Die Klonierung des Strukturgens im induzierbaren System sollte die Vorraussetzungen zur Erzeugung von Proteinen schaffen, bei denen Aminosäurereste gezielt verändert werden können, die als wichtig für die Funktion des Proteins identifiziert wurden. Da nicht auszuschließen ist, daß solche Mutationen letale Wirkung auf die Zellen haben, ist die Verwendung von Plasmiden mit konstitutiver Expression der Proteine nicht möglich.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Natrium-dodecylsulfat (**SDS**)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau (**BPB**)	-"-
Xylencyanol FF	-"-
Ethidium-Bromid (**EthBr.**)	-"-
2,5 Diphenyloxazole (**PPO**)	Packard instrumemts, USA
1,4-bis-[2-(5-Phenyloxazolyl)]-Benzene (**POPPO**)	-"-
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (**IPTG**)	Boehringer, Mannheim
5-Bromo-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (**X-gal**)	-"-
Acetonitril (spectrapur)	Merck, Darmstadt
Nitromethan (spectrapur)	-"-
Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz (Na_2**EDTA**)	-"-

Für DNA-Seqenziergele:

Acrylamid	("ultrapure")	Bio-Rad Laboratories, USA
N,N'-Methylenbisacrylamid (**Bisacrylamid**)	("ultrapure")	-"-
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (**TEMED**)	("ultrapure")	-"-
Harnstoff	("ultrapure")	-"-

Für Oligonukleotidsynthese:

Alle für die manuelle Oligonukleotidsynthese in 2.11 verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel wurden, falls nicht anders angegeben, vom Reinheitsgrad "DNA-grade" der Firma "Applied Biosystems", England verwendet.

Alle weiteren Standardchemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt vom Reinheitsgrad pro analysi (p.a.) verwendet.

2.2 Radiochemikalien (Isotope)

Adenosin-5'-[α-^{32}P]Triphosphat (α[^{32}P]-dATP)	Amersham & Buchler, Braunschweig
Cytosin-5'-[α-^{32}P]Triphosphat (α[^{32}P]-dCTP)	-"-
Adenosin-5'-[γ-^{32}P]Triphosphat (γ[^{32}P]-ATP)	-"-

Aktivitäten der Isotope:
>400 Ci/mmol , ~800 Ci/mmol oder ~3000 Ci/mmol mit 10 μCi/μl

f[^{3}H]Met-tRNA und NAc[^{14}C]Phe-tRNA wurden freudlicherweise von M. Canonaco zur Verfügung gestellt.

2.3 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim; New England Biolabs, USA; Pharmacia P-L, Freiburg; Bethesda Research Laboratories (BRL), USA
T4 DNA Ligase	Pharmacia P-L, Freiburg; New England Biolabs, USA
T4 Polynukleotid Kinase	Pharmacia P-L, Freiburg; New England Biolabs, USA
DNA Polymerase I	Boehringer, Mannheim
DNA Polymerase I "large fragment" ("Klenow"-Fragment)	Pharmacia P-L, Freiburg; New England Biolabs, USA; Pharmacia P-L, Freiburg

Lysozym	Boehringer, Mannheim
DNase I	–"–
RNase A	Sigma, USA

2.4 Verschiedenes

Agarose:	
low molecular weight (lm_r)	Bio-Rad Laboratories, USA
low gel temperature	–"–
SeaKem ME	FMC Bioproducts, USA
Nitrocellulosefilter Typ HAWP (Porengröße 45 µm)	Millipore, Frankreich
Dialyseschläuche Spectrapor 3	Spectrum Medical Industries, USA
P11 Phosphate-Cellulose (P.-Cell.)	Whatman Chemical Separation Ltd., England
HPLC-Säulen:	
Trenn-Säule (0.46 x 25 cm)	Knauer, Berlin
Vorsäule (0.46 x 30 mm)	–"–
Säulenfüllung :	
ODS-Hypersil 5µ (ODS-Säule)	Shandon Southern Products Ltd., England
Sterilfilter:	
Nalgene Typ S CN	Nalgene Company, USA
Milex	Millipore, Frankreich
Grundstoffe für die Nährmedien:	
Bacto-Tryptone	Difco, USA
Hefeextrakt (Yeast extract)	–"–
Agar	–"–
Kodak Kasetten mit Kodak-O-matic Verstärkerfolien	Kodak, USA

Filme:	
Fuji RX	Fuji, Japan
Polaroid Typ665 (Negativfilm)	Polaroid, USA
Typ667	

2.5 Geräte

Tischzentrifugen:	
Christzentrifuge	Heraeus, Mannheim
Centrifuge 5414	Eppendorf, USA
Select-a-fuge 24	Bio-Dynamics, USA
Microfuge B	Beckman, USA
Ultrazentrifugen:	
L5·65, L8-55, L8-70M	-"-
Szintillisationszähler:	
LS 700	-"-
HPLC-Anlage: 2 Pumpen Model 110A;	
Steuer- und Programmeinheit	
Model 460.	-"-
UV-Transilluminator:	
UVT 2020 (302 nm)	Herolab, St. Leon-Rot
Vortex-Genie	Bender & Holbein, Schweiz
LKB-Macrophor Sequenzierungs-einheit	LKB-Instruments, Schweden
Biometra-Elutionskammer	biomed. Analytik GmbH, Göttingen
Wasserbadschüttler G76	New Brunswick Scientific, USA
Mixer 5432	Eppendorf, USA
Photometer MQ3	Zeiss, Berlin

2.6 Allgemeine Methoden

2.6.1 Verwendete Medien

LB-Medium : pro Liter	10	g	Bacto-Tryptone
	5	g	Bacto-Hefeextrakt
	5	g	NaCl
YT-Medium : pro Liter	8	g	Bacto-Tryptone
	5	g	Bacto-Hefeextrakt
	5	g	NaCl
AN-Medium : pro Liter	1	g	$(NH_4)_2SO_4$
	7	g	K_2HPO_4
	3	g	KH_2PO_4
	0,5	g	Na_3-Citrat$\cdot 3H_2O$
	20	mg	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
	10	ml	Glucose (50% w/v)

Zu den Medien wurden bei Bedarf Aminosäuren in einer Konzentration von 50 µg/ml und Vitamin B_1 in einer Konzentration von 5 µg/ml zugegeben. Die Bacto-Agar Konzentration betrug 2% (w/v) für Platten und 0,5% (w/v) für Weichagar.

Endkonzentrationen der Antibiotika:

Ampicilin	60 µg/ml	(Sigma, USA)
Chloramphenicol	40 µg/ml	(Boehringer, Mannheim)
Kanamycin	25 µg/ml	(Boehringer, Mannheim)
Tetracyclin	10 µg/ml	(Boehringer, Mannheim)

2.6.2 Verwendete Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
DH1	F$^-$, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r_K^-,m_K^+), supE44, λ^-	K. Isono, MPI Berlin (Hanahan, 1983)
RR1	F$^-$, hsdR514 (r_B^-,m_B^-), ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsl20, xyl-5, mtl-1, supE44, λ^-	A. Böck, München (Bolivar et al., 1977)
JM103	Δ(lac-pro), thi, strA, supE, endA, sbcB, hsdR$^-$; F'traD36, proAB, lacI^{q}ZΔM15	J. Schnier, MPI Berlin (Messing et al., 1981)
JM105	Δ(lac-pro), thi, strA, hsdR4, endA, sbcB; F' traD36, proAB, lacI^{q}ZΔM15	J. Schnier, MPI Berlin (Yanisch-Peron et al., 1985)
BMH71-18 mutS	Δ(lac-proAB), thi, supE, mutS::Tn10; F' lacI^{q}ZΔM15, proAB	W. Jansen, MPI Berlin (Kramer et al., 1984)
K-12ΔH1Δtrp	=M72 Sm^r, lacZam, Δbio-uvrB, ΔtrpEA2, (λNam7-Nam53cI857ΔH1)	E. Remaut, Belgien (Bernard et al. 1979)

2.6.3 Stammlösungen für Medienzusätze

50% (w/v) Glucosemonohydrat in H_2O (autoklaviert)

1 M Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) pH 8 (autoklaviert)

Antibiotika:

10 mg/ml Ampicillin (Natriumsalz) in H_2O (filtersterilisiert)

40 mg/ml Chloramphenicol in Ethanol absolut

25 mg/ml Kanamycinsulfat in H_2O (filtersterilisiert)

10 mg/ml Tetracyclin in 50% (v/v) Ethanol (filtersterilisiert)

2.6.4 Behandlung von Materialien für das Arbeiten mit DNA und RNA

Alle Materialien wie Eppendorfreaktionsgefäße (Epp.), Gilson Pipettenspitzen und Glasgeräte für die Arbeiten mit DNA und RNA wurden im Autoklaven für 20 Min. bei 124 °C (ca. 1.5 bar) von DNase- bzw. RNase-Aktivität befreit. In gleicher Weise wurden auch H_2O bidest. und alle Lösungen, soweit nicht anders erwähnt oder soweit dies nicht erforderlich war, behandelt. Phenol wurde mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na_2EDTA, pH 8) solange ausgeschüttelt, bis sich ein pH von ~6.5 im wässrigen Pufferüberstand einstellte.

2.6.5 Radioaktivitätsmessungen

^{32}P, ^{14}C und ^{3}H markiertes radioaktives Material auf Nitrozellulosefiltern wurde zum quantitativen Nachweis in Zinsser Plastikröhrchen im Flüssig-Szintillationssystem gezählt. Hierzu wurde zu den Proben je 4 ml einer Lösung aus 3.6 g PPO, 0.9 g POPOP in 1 Liter Toluol zugegeben und die Röhrchen wurden im Szintillationsspektrometer Beckman LS 700 mit dem vorprogrammierten Programm für das jeweilige Isotop gezählt. Der Maschinenblindwert betrug 25 ± 10 cpm.

2.6.6 Autoradiographie

Der Nachweis von radioaktiv markiertem DNA-Material in Gelen und auf Nitrozellulose-Filtern erfolgte durch Auflegen von Röntgenfilmen (Fuji X-Ray Film Medical). Nitrozellulosefilter wurden in Frapan-Folie eingehüllt und zusammen mit dem Film in lichtdichten Kassetten mit Verstärkerfolien (Kodak X-Omatic, Regular) bei -80 °C exponiert. Auf getrocknete DNA-Sequenzgele (vgl. 2.9.3) wurde der Röntgenfilm direkt aufgelegt, mit einer Glasplatte angedrückt und in lichtdichten Plastikkontainern bei Raumtemperatur (Rt.) exponiert. Die Expositionszeiten variierten je nach Strah-

lungsaktivität für Nitrozellulosefilter zwischen 8 Std. und 7 Tagen und für "Sequenzgele zwischen 12 und 48 Std. Die Schwärzung der Filme wurde mit handelsüblichen Entwickler- und Fixierlösungen sichtbar gemacht.

2.6.7 Präzipitationen aus Lösungen

Soweit nicht anders erwähnt, wurden DNA, RNA und Deoxy-oligoribonukleotide durch Zugabe von 1/10 des Volumens der Lösung 3 M Na-Acetat, pH 5.2, und Zugabe von 2-3 Volumina der Lösung Ethanol entweder über Nacht bei -20 °C oder für 30-60 Min. bei -80 °C präzipitiert.

2.6.8 Anzucht, Wachstum und Lagerung von Bakterienstämmen

2.6.8.1 Sterilisation von Glasgeräten und Lösungen

Alle Glasgeräte für die Arbeit mit Bakterien wurden im Hitzeschrank bei 160 °C für mindestens 3 Std. trocken sterilisiert. Lösungen und Medien wurden im Autoklaven bei 124 °C (ca. 1.5 bar) für 20 Min. autoklaviert. Lösungen thermisch labiler Substanzen wurden durch 45 µm Sterilfilter (Nalgene und Milex) filtriert.

2.6.8.2 Lagerung von Bakterienstämmen

Für die kurzzeitige Lagerung bis zu 2 Monaten wurden die Bakterienkulturen auf Selektivagarplatten zu Einzelkolonien ausgestrichen und bei 4 °C aufbewahrt. Die Bakterienstämme wurden als Glycerolstammkulturen für die längere Lagerung eingefroren. Hierzu wurde 1 ml einer frischen Übernachtkultur zu 0.5 ml sterilem Glycerin in 2 ml Glasröhrchen zugegeben und die Mischung bei -20 °C eingefroren.

2.6.8.3 Wachstum von Bakterien

Als Ausgangskulturen für alle Wachstumsversuche wurden 10 ml Übernachtkulturen (Ünk.) verwendet. Dazu wurden 10 ml Selektivmedium mit Einzelkolonien von der Agarplatte oder 0.05 ml aus einer Glycerolstammkultur angeimpft und die Kultur über Nacht im Wasserbad bei 37 °C oder 30 °C geschüttelt. Exponentiell wachsende Bakterienkulturen wurden hergestellt, indem die Ünk. eins zu hundert mit frischem Selektivmedium verdünnt wurde und diese Kulturen bei guter Belüftung im Wasserbad geschüttelt wurden. Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit wurden den Kulturen Proben entnommen und die Absorption bei einer Wellenlänge von 620 nm (A_{620nm}) im Zeiss Photometer gemessen.

2.6.8.4 Bakterienkulturen für die Isolierung von Plasmiden

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden alle Bakterien über Nacht in entsprechendem Selektivmedium mit 20 mM MOPS und 0.5% (w/v) Glucose bei 30 °C oder 37 °C im Wasserbad geschüttelt.

2.6.8.5 Anzucht von M13 Phagen in Bakterienstämmen

Zu 2.5 ml YT-Medium in sterilen Corex Glaszentrifugenröhrchen mit Metallkappen wurde ein Tropfen einer Ünk. von JM103 oder JM105 (vgl. Tab.1) zugegeben und diese Kultur mit M13 Phagen aus einem einzelnen Plaque infiziert. Die Kulturröhrchen wurden für 6 Std. im Wasserbad bei 37 °C heftig geschüttelt. Das Zellsediment aus 2 ml dieser Kultur wurde für die Isolierung der replikativen Form (RF) (vgl. 2.6.11) verwendet, während der Überstand für die Isolierung der einzelsträngigen DNA (ss-DNA) aus den Phagenpartikeln (vgl. 2.6.12) diente.

2.6.8.6 Induktion von Bakterienstämmen mit hitzelabilem cI857 Lambda Repressor

Für die Hitzeinduktion von unterhalb ("downstream") des λP_L-Promotor klonierten Proteingenen durch Inaktivierung des hitzelabilen cI857 λ-Repressors wurden die Bakterienkulturen bis zu einer A_{620nm} von 0.85 bei 30 °C angezogen (vgl. 2.6.8.3). Die Kulturen wurden dann langsam schüttelnd für 15 Min. bei 42 °C inkubiert und für weitere 90 Min. bei 38 °C heftig geschüttelt.

2.6.9 Transformation von Bakterienstämmen mit Plasmiden oder M13 RF-DNA

Kompetente Bakterienzellen für Transformationen wurden nach der Calciumschock-Methode mit 50 mM $CaCl_2$ wie beschrieben hergestellt (Maniatis et al., 1982).

Mit Plasmid-DNA transformierte Bakterien wurden im Anschluß an den Hitzeschock (2 Min. bei 42 °C) für 30-45 Min. bei 30 °C oder 37 °C in LB-Medium inkubiert und auf Selektivagarplatten in Mengen von 0.1-0.4 ml pro Platte ausplattiert. Die Platten wurden bei der entsprechenden Temperatur inkubiert, bis Kolonien sichtbar wurden (24-48 Std.).

Mit M13 RF-DNA transformierte Bakterien wurden wie folgt ausplattiert. Zu je 0.2 ml Zellen wurden nach dem Hitzeschock (wie oben) 10 µl einer 100 mM IPTG-Lösung, 3 Tropfen einer exponentiell wachsenden Bakterienkultur (JM103 od. JM105) und 2.5 ml auf 45-50 °C vorgewärmter YT-Weichagar zugefügt. Dazu wurden 50 µl einer 2%igen (w/v) X-gal-Lösung in Dimethylformamid (DMF) gegeben und die gesamte Lösung nach kurzem Mischen auf dem Vortex sofort auf YT-Agarplatten ausgegossen und gleichmäßig verteilt. Die YT-Platten wurden zuvor auf 42 °C vorgewärmt und wurden, nachdem der Weichagar festgeworden war (nach ca. 20 Min.), bei 37 °C inkubiert. Nach 6-12 Std. wurden Plaques sichtbar.

2.6.10 Ligationen

Alle Ligationen wurden mit DNA-Konzentrationsverhältnissen und im Puffer durchgeführt, wie von Maniatis et al. (1982) beschrieben. Die Ligationsansätze wurden für 4-8 Std. bei 15 °C mit T4 DNA-Ligase inkubiert. DNA-Fragmente mit stumpfen ("blunt") Enden wurden für 2 Std. bei Rt. mit T4 DNA-Ligase inkubiert, und DNA-Fragmente mit EcoRI-Enden wurden für 4-8 Std. bei 8 °C mit T4 DNA-Ligase inkubiert.

2.6.11 Isolierung von Plasmid-DNA und M13 RF-DNA

Plasmid-DNA und M13 RF-DNA wurde nach der Alkali-Lyse-Methode wie von Birnboim und Doly (1979) beschrieben isoliert. Falls erforderlich, wurde die DNA (z.B. bei der Isolierung von Plasmid-DNA von Klonierungsvektoren) mittels CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation (Maniatis et al., 1982) nachgereinigt. Plasmid- oder RF-DNA wurde in 10 mM Tris-HCl pH 8 + 1 mM Na_2EDTA mit 0.5 µg/ml RNaseA, die von DNase-Aktivität befreit worden war (Maniatis et al., 1982), bei 4 °C gelagert.

2.6.12 Isolierung von M13 Einzelstrang-DNA (ss-DNA)

Die Isolierung von ss-DNA aus M13-Phagenpartikeln wurde, wie von Sanger et al. (1980) beschrieben, mit folgenden Abänderungen durchgeführt. Zu 800 µl eines Zellüberstandes mit M13-Phagen (vgl. 2.6.8.5) wurden 200 µl einer 2.5 M NaCl Lösung mit 20% (w/v) Polyethylenglycol (PEG) 6000 zugegeben. Nach kurzem Mischen wurde die Lösung für 20 Min. bei Rt. gehalten und die präzipitierten Phagenpartikeln für 5 Min. (15000 Upm, Eppendorfzentrifuge) abzentrifugiert. Das Phagensediment wurde in 100 µl TES-Puffer* aufgenommen und für 10 Min. mit 100 µl Phenol auf dem Mixer (Mixer 5432, Eppendorf) schüttelnd extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Oberphase nochmals mit 1 Vol. Phenol/Chloroform

(1:1) extrahiert und die ss-DNA über Nacht bei -80 °C präzipitiert (vgl. 2.6.7).

* TES-Puffer : 10 mM Tris-HCl pH 8
1 mM Na_2EDTA
50 mM NaCl

2.6.13 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA wurde für analytische und präparative Zwecke in Mengen von 500 ng bis 5 µg und in Volumina von 20-100 µl TA-Puffer (O'Farrell et al., 1980) für 2-12 Std. mit 2-5 Enzymeinheiten (U) pro µg DNA bei 37 °C inkubiert. Lediglich für SalI wurde NaCl bis zu einer Konzentration von 150 mM zugefügt, und die Reaktion mit BssHII wurde bei 42 °C durchgeführt.

2.6.14 Isolierung von chromosomaler DNA

Chromosomale DNA aus Bacillus stearothermophilus 799 wurde wie von Smith (1967) beschrieben isoliert.

2.6.15 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die wie unter 2.9.1 beschrieben aufgetrennten DNA-Fragmente wurden aus "low gel temperature"-Agarose wie von Maniatis et al. (1982) beschrieben mit Phenol extrahiert.

Aus Seakem ME Agarosegelen wurden die DNA-Fragmente ausgeschnitten und die Agarose in ca. 2-4 mm dicke Scheibchen zerlegt. Diese wurden in das Elutionsgefäß der Biometra-Elektroelutionskammer gegeben, und die DNA wurde mittels Elektroelution (1 Std. bei 120 V) in 50 µl einer 3 M Na-Acetat-Lösung (ungepuffert, mit 0.1% (w/v) BPB angefärbt) überführt. Der TBE-Elutionspuffer (vgl. 2.9.1) wurde dazu im V-förmigen Elutionskanal mit dieser Lösung unterschichtet.

Nach Beendigung der Elution wurde die Na-Acetat-Lösung mit der DNA in 1.5 ml Epp. überführt und die DNA nach Zugabe von 2 Volumina H_2O bidest. und 2.5 Volumina Ethanol für 1 Std. bei -20 °C aus der Lösung gefällt, wobei der BPB-Farbstoff im Überstand verblieb.

2.6.16 Bestimmung der Kopienzahl von Plasmiden

Die Kopienzahl von Plasmiden wurde wie von Stueber und Bujard (1982) beschrieben mit folgenden Abänderungen bestimmt. Das wie in 2.6.11 beschrieben aus Zellen isolierte Plasmid/RNA-Lysat wurde zum Ausgleich von Ausbeuteunterschieden bei verschiedenen Stämmen anhand der erhaltenen RNA bei vergleichbaren Proben auf gleiche A_{260nm}-Werte eingestellt (Stueber und Bujard, 1982). 0.5 A_{260nm} des RNA/Plasmidextraktes wurden zur Linearisierung der Plasmid-DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym in TA-Puffer (vgl. 2.6.13) mit 0.5 µg RNaseA pro ml (vgl. 2.6.11) inkubiert. Die linearisierte Plasmid-DNA wurde auf einem 0.8% (w/v) Agarosegel ohne Ethidium-Bromid aufgetrennt und dieses zur Anfärbung der DNA anschließend in einer 0.5 µg/ml EthBr.-Lösung in H_2O für 30 Min. geschüttelt. Die Gele wurden mit Polaroid Typ665 Negativfilmen photographiert, und die Intensität der Plasmid-Banden auf den Negativen wurde mit Transmissionsdensitometrie bei 525 nm oder 633 nm (Zeinek Soft Laser Scanning Densitometer SL-504-XL) ermittelt. Die Densitogramme wurden digitalisiert, gespeichert (Apple IIc Personal Computer) und anschließend mit Hilfe eines Integrationsprogramms (ERIP-V 3A, Biomed Instruments) ausgewertet. Die ermittelten Werte wurden relativ zu den Werten angegeben, die für den jeweiligen Plasmid-Vektor unter gleichen Bedingungen erhalten wurden.

2.6.17 Umwandlung von 5' hervorstehenden DNA-Enden in stumpfe ("blunt") Enden

5' hervorstehende DNA-Enden wurden wie von Maniatis et al. (1982) beschrieben mit DNA-Polymerase I "Klenow"-Fragment in Anwesenheit aller vier Deoxynukleotidtriphosphate (dNTP) (0.25 mM) aufgefüllt.

2.6.18 Markierung von DNA-Fragmenten mit radioaktiven Deoxynukleotidtriphosphaten

100-300 ng eines gereinigten DNA-Fragmentes wurden in 50 µl Reaktionsgemisch wie von Maniatis et al. (1982) beschrieben in Anwesenheit von 1 oder 2 radioaktiven (vgl. 2.8.2) ^{32}P-Deoxynukleotidtriphosphaten für 90 Min. bei 15 °C inkubiert. Die DNA-Polymerase I wurde durch Zugabe von 2 µl 0.5 M Na_2EDTA-Lösung, pH 8, und Inkubation für 5 Min. bei 65 °C inaktiviert.

Die radioaktiv markierte DNA wurde von nicht eingebauten ^{32}P-dNTPs durch fraktioniertes Zentrifugieren über eine Sephadex G50 Säule gereinigt ("spun-column-method"; Maniatis et al., 1982). Hierzu wurden Fraktionen von 50-100 µl des angegebenen Puffers in der Christ-Tischzentrifuge für 3 Min. bei 300 UpM über die Säule zentrifugiert. Die Fraktionen des radioaktiven Gipfels (meist 1-3) wurden vereint und nach der Strangtrennung der DNA den Hybridisierungslösungen zugefügt (vgl. Maniatis et al., 1982).

2.7 RNA-"dot-blot"-Hybridisierung auf Nitrozellulose-filtern

2.7.1 Extraktion von gesamter zellulärer RNA

Die Extraktion der gesamten zellulären RNA aus *E. coli* Zellen wurde wie von Coleman et al. (1984) beschrieben durchgeführt. Das getrocknete RNA-Sediment wurde in 300 µl

einer Lösung mit 1 mg/ml DNaseI + 1 mg/ml Proteinase K in 25 mM Tris-HCl pH 7.5 + 10 mM $CaCl_2$ für 2 Std. bei 37 °C inkubiert. Diese Lösung wurde für 3 Std. bei 37 °C vorinkubiert, um die DNase I von RNase-Aktivität zu befreien (Tullis und Rubin, 1980). Die RNA wurde einmal mit Phenol extrahiert und präzipitiert (vgl. 2.6.7), und die präzipitierte RNA wurde bei 15000 UpM für 5 Min. (Eppendorfzentrifuge) sedimentiert und anschließend getrocknet.

2.7.2 Bindung von RNA an Nitrozellulosefilter

Die getrocknete RNA wurde wie von Thomas (1983) beschrieben mit Glyoxalhydrat denaturiert und in verschiedenen RNA-Konzentrationen auf die vorbehandelten Filter in 4 µl Portionen aufpipettiert. Die Filter wurden nach dem Trocknen für 2 Std. im Vakuumofen bei 80 °C gebacken und wie in 2.8.2 beschrieben hybridisiert.

2.8 Hybridisierungsbedingungen

2.8.1 Heterologe DNA-DNA-Hybridisierung auf Nitrozellulosefiltern

Je 5 µg chromosomale DNA aus B. stearothermophilus (vgl. 2.6.12) wurden mit Restriktionsenzymen verdaut (vgl. 2.6.13) und auf 0.7% (w/v) Agarosegelen aufgetrennt. Die DNA wurde wie von Maniatis et al. (1982) beschrieben auf Nitrozellulosefilter (HAWP-Nitrocellulose, Millipore) übertragen und für die Identifizierung von kreuzhybridisierenden DNA-Fragmenten mit heterologen, radioaktiv markierten DNA-Fragmenten (vgl. 2.6.16) des E. coli infB Gens wie von Brombach et al. (1986) beschrieben hybridisiert (vgl. 3.1.2).

2.8.2 Hybridisierung von an Nitrozellulose gebundener RNA mit radioktiv markierter DNA

Die an Nitrozellulosefilter gebundene RNA (vgl. 2.7.2) wurde mit radioaktiv markierten E. coli infC DNA-Fragmenten unter Bedingungen hybridisiert, wie sie von Maniatis et al. (1982) für die Plaquehybridisierung mit λ-Phagen-DNA auf Nitrozellulosefiltern beschrieben wurden. Die Filter wurden nach der Hybridisierung einmal oder zweimal in 250 ml 0.1 x SSC* + 0.1% (w/v) SDS bei 68 °C gewaschen, je nachdem ob die Hintergrundradioaktivität des Filters nach der ersten Waschung niedrig genug war (vgl. Maniatis et al., 1982).

* 20fach SSC : 3 M NaCl
0.3 M Na-Citrat

Anmerkung: Zum Nachweis der anteilmäßig geringen infC mRNA in der gesamten zellulären RNA wurden die DNA-Fragmente wie unter 2.6.18 beschrieben in Anwesenheit von zwei ^{32}P-Deoxynukeotiden (meist dATP und dCTP) mit einer spezifischen Aktivität von ~3000 Ci/mmol markiert.

2.9 Elektrophoretische Methoden

2.9.1 Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden in horizontalen 0.7-2.0%igen (w/v) Agarosegelen bei 60-120 V für 1-3 Std. aufgetrennt (Maniatis et al., 1982). Dem TBE-Puffer* im Gel wurde EthBr. in einer Konzentration von 0.5 µg/ml zugesetzt. Für analytische Gele wurden Seakem ME und Bio Rad (lm_r) Agarose und für präparative Agarosegele Seakem ME und Bio Rad "low gel temperature"-Agarose verwendet. Die Gele wurden auf dem UVT 2020 Transilluminator bei 302 nm mit Polaroid Filmen (Typ 665 oder 667) photographiert.

* TBE-Puffer: 50 mM Tris-Base
(pH 8.3) 50 mM Borsäure
1 mM Na_2EDTA

2.9.2 Auftrennung von Proteinen

2.9.2.1 SDS-Polyacrylamid (PAA) - Gelelektrophorese (PAGE)

Die eindimensionale Auftrennung von Proteinen und der Nachweis der Initiationsfaktoren erfolgte in 7- oder 12.5%igen (w/v) SDS-PAA-Gelen (10 cm lang, 15 cm oder 30 cm breit, 4 mm dick) wie von Laemmli (1970) beschrieben. Die Gele mit den Proteinen wurden für 30-90 Min. in Färbelösung* geschüttelt und über Nacht bei mehrmaligen Wechsel der Entfärbelösung** entfärbt.

* Färbelösung: 1 g Serva "brilliant blue"
100 ml Methanol (techn. Grad)
100 ml Essigsäure (-"-)

mit deionisiertem H_2O auf 1 L aufgefüllt,
über Nacht gerührt und vor Gebrauch gefiltert

** Entfärbelösung: 100 ml Methanol (techn. Grad)
100 ml Essigsäure (-"-)

mit deionisiertem H_2O auf 1 L aufgefüllt

2.9.2.2 Zweidimensionale- (2D)-Gelelektrophorese

Ribosomale Proteine wurden im 2D-Gelsystem wie von Geyl et al. (1981) beschrieben aufgetrennt. Auf dem Gel der ersten Dimension in Glasröhren (10 cm lang, ø 6 mm) wurden 100-150 µg Protein aufgetrennt. Die Elektrophorese der zweiten Dimension erfolgte in Plexiglaskammern (Eigenbau des MPI Berlin) mit 5 parallelen Gelen (10 cm lang, 10 cm breit,

4 mm dick) pro Kammer im Kühlraum bei 4 °C und 80 V für 16-18 Std. Die Gele wurden wie oben beschrieben gefärbt und entfärbt.

2.9.3 DNA-Sequenzierungsgele

Die Produkte der DNA-Sequenzierungsreaktionen wurden mit der LKB Makrophor Sequenzierungseinheit auf 0.1 mm dicken 6- oder 8%igen (w/v) PAA-Gelen mit 7 M Harnstoff aufgetrennt. Die Herstellung der Gele und die Benutzung des Systemes folgte der mitgelieferten Anleitung. Die Elektrophoresen wurden jeweils bei 50 °C und 68 °C (vgl. Brombach et al., 1986) bei 2200-2500 V für 3-6 Std. mit TBE-Lauf- und Gel-puffer* durchgeführt. Die DNA wurde 45 Min. in 10%iger (v/v) Essigsäure schüttelnd fixiert und das Gel mit einem handels-üblichen Heizlüfter getrocknet. Die Autoradiogramme wurden nach 12-24 Std. entwickelt (vgl. 2.6.6) und ausgewertet (vgl. 2.10.3).

* 10fach TBE-Puffer: 121.0 g Tris-Base
56.86 g Borsäure
3.72 g Na_2EDTA

mit H_2O bidest auf 1 L aufgefüllt ist der pH 8.4.

2.10 DNA-Sequenzierung mit der Dideoxy-Kettenabbruch ("chain-terminating") Methode

Die Sequenzierung von zirculärer Einzelstrang-DNA wurde mittels Kettenverlängerung am Primer (15mer oder 17mer "universal primer", Pharmacia P-L), wie sie im wesentlichen von Sanger et al. (1977) beschrieben wurde, durchgeführt.

2.10.1 Herstellung der Sequenzierungsmischungen

Die Deoxynukleotide (dNTP) wurden in H_2O bidest.(etwa

10 mM) gelöst. Es wurde der pH mit 100 mM Tris-Base (ungepuffert) unter Verwendung von Indikatorpapier (Neutralit; Merck, Darmstadt) auf etwa 6.5-7.0 eingestellt. Die genauen Konzentrationen der dNTP wurden mit folgenden Extinktionskoeffizienten (ε) bestimmt.

	λmax (pH 7.0)	εmax X 10^{-3} (pH 7.0)
dATP :	259	15.2
dCTP :	271	9.1
dGTP :	253	13.7
dTTP :	267	9.6

Von den Stammlösugen bekannter Konzentration wurden 0.5 mM dNTP-Lösungen hergestellt, die für die Herstellung der folgenden als "A-null" (A°) etc. bezeichneten Mischungen verwendet wurden:

	A°	C°	G°	T°
0.5 mM dATP	1µl	20µl	20µl	20µl
0.5 mM dGTP	20µl	20µl	1µl	20µl
0.5 mM dTTP	20µl	20µl	20µl	1µl
H_2O	20µl	20µl	20µl	20µl

Aus den fertigen 10 mM Lösungen (Parmacia P-L) der 2',3'-Dideoxynukleosid-5'-Triphosphate (ddNTP) wurden Lösungen mit 0.2 mM von ddATP, 0.1 mM von ddCTP, 0.3 mM von ddGTP and 0.5 mM von ddTTP hergestellt.

Die als "A-mix", "C-mix" etc. bezeichneten Nukleotidgemische für die Sequenzierungsreaktion wurden durch Mischen von jeweils gleichen Volumina A° und 0.2 mM ddATP, C° und 0.1 mM ddCTP etc. hergestellt. Die "mix"-Lösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt und für etwa 1-1½ Monate verwendet.

2.10.2 Sequenzierungsreaktion

In einem 0.5 ml Epp. wurden 250-700 ng M13 ss-DNA und 0.02 A_{260nm} M13 Einzelstrang-"primer" mit 1.5 µl 10fach Reaktionspuffer* gemischt und mit H_2O bidest. auf 10 µl aufgefüllt. Die Mischung wurde für 10 Min. bei 65 °C inkubiert und im Wasserbad langsam (in ca. 1 Std.) auf Rt. abgekühlt.

Es wurden vier 0.5 ml Epp. mit A, C, G und T beschriftet, und auf den Boden des jeweiligen Epp. wurden 2 µl der "A-mix", "C-mix" etc. Mischung aus 2.10.1 pipettiert.

Zur obigen ss-DNA/"primer"-Mischung wurden 1-3 µl $\alpha[^{32}P]$-dCTP (~400 Ci/mmol) und 2-4 Enzymeinheiten (U) DNA-Polymerase I "Klenow"-Fragment zugefügt. Je 2.5 µl dieser Mischung wurde an die Wand der obigen Epp. pipettiert, und die Reaktion wurde in allen Epp. gleichzeitig durch kurzes Zentrifugieren in der Minifuge gestartet.

Das Reaktionsgemisch wurde für 15 Min. bei 30 °C inkubiert, und es wurde in gleicher Weise mit der Minifuge 1 µl einer 0.25 mM Lösung aller dNTP ("chase-mix") zugefügt. Die Inkubation wurde für 15 Min. bei 30 °C fortgeführt und durch Zugabe von 5 µl Probenpuffer** und Inkubation für 5 Min. bei 100 °C gestoppt. Hiervon wurde etwa 3 µl pro Gelspur wie in 2.9.3 beschrieben aufgetrennt.

* 10fach Reaktionspuffer: 100 mM Tris-HCl pH 8.0
50 mM $MgCl_2$

** Probenpuffer : 95 % (v/v) Formamid
0.1% (w/v) Xylencyanol FF
0.1% (w/v) Bromphenolblau
10 mM Na_2EDTA pH 8

Das Formamid wurde mit "mixed-bed-resin" (Bio-Rad AG 501-X8) vor jeder Herstellung frisch deionisiert.

Anmerkung: Im letzten Teil der Arbeit wurden für die DNA-Sequenzierung DNA-Sequenzierungs-"kits" verwendet, die alle Nukleotide (dNTP, ddNTP) für die Herstellung der Sequenzierungsmischungen in 10 mM Lösungen enthielten. Es wurden dann teilweise die von den Herstellungsfirmen empfohlenen Konzentrationen für ddNTP übernommen, wobei generell anzumerken ist, daß das Bandenmuster je nach Alter und Qualität ("lot") der verwendeten Nukleotide sowie Präparation und Basenzusammensetzung der ss-DNA schwanken kann. Ein gleichmäßiges Bandenmusters konnte aber durch Mischen unterschiedlicher Volumina von "null"-Lösung und ddNTP-Lösung für alle "mix"-Lösungen erzielt werden.

2.10.3 Auswertung der Autoradiogramme von DNA-Sequenzgelen

Die Autoradiogramme (vgl. 2.6.6 und 2.9.3) wurden als Einzelgele im DEC 2020 Computer mit Hilfe des Programms "DATBAS" (Isono, 1984) zur Gesamtsequenz ("consensus") zusammengefügt. Die Consensus-Sequenz wurde mit dem Programm "NUCDAT" (Isono, 1984) am DEC 2020 Rechner oder mit der "Wisconcin-software" (Devereux et al., 1984) am VAX 8600 Rechner in Proteinsequenzen übersetzt und zu Homologievergleichen verwendet.

2.11 Synthese von Oligodeoxyribonukleotiden

2.11.1 Syntheseprinzip und Chemie

Oligodeoxyribonukleotide definierter Sequenz wurden nach dem Phosphittriester-Verfahren an fester Phase manuell synthetisiert (Sproat and Gait, 1984). Als Reagenzien wurden die 5'-O-Dimethoxytrityldesoxyribonukleosid-3'O-diisopropyl Phosphoramidite eingesetzt. Die Phoshoramidite wurden in 3'-5' Richtung schrittweise im zyclischen Prozeß verknüpft, wobei das Startnukleosid über eine Succinester-Bindung an inerte Silica- oder CPG-("controlled pored glass")Träger ge-

koppelt war. Die Schutzgruppen der verwendeten Nukleoside, sowie der chemische Verlauf der Teilreaktionen waren wie beschrieben (Sproat and Gait, 1984).

2.11.2 Manueller Synthesezyclus

Die Synthese der Oligodeoxyribonukleotide erfolgte bei Rt. in einer mit Gummisepten abgedichteten 2 ml Glasfritte (vgl. Sproat und Gait, 1984) unter Argon-Schutzgasatmosphäre. Die Reagenzien und Waschlösungen wurden in den Reaktionsraum eingespritzt und über ein zuschaltbares Vakuum aus der auf eine Vakuumflasche aufgesetzten Glasfritte wieder abgesaugt. Die Glasgeräte wurden vor der Synthese bei 180 °C für 12-16 Stunden getrocknet und über Trockenmittel aufbewahrt. Die gelösten Reagenzien wie die zum Einspritzen in den Reaktionsraum notwendigen Glasspritzen wurden während der Synthese im mit Argon gefüllten Exsikkator aufbewahrt. Für eine Synthese wurden 1.5 µmol des an den Silica- oder CPG-Träger gekoppelten Startnukleosides verwendet (je nach Beladungsgrad 30-60 mg). Mit Ausnahme des Kondensationsschrittes wurden Lösungsmittel der Reinheitsstufe "spectrapur" (Merck, Darmstadt) verwendet.

2.11.2.1 Veresterung freier 5'-Hydroxylgruppen ("capping-Reaktion")

Je 150 µl CapA-* und CapB-Lösung** wurden gemischt und in das Reaktionsgefäß überführt. Nach 2 Min. Reaktionszeit wurde die Reagenzlösung abgesaugt und das Trägermaterial wurde 4 mal mit 1 ml Acetonitril und 3 mal mit 1 ml Nitromethan gewaschen.

*CapA-Lösung: Essigsäureanhydrid/2.6-Lutidin/Tetrahydrofuran (1:1:8)

**CapB-Lösung: 6.5 % Dimethylaminopyridin in Tetrahydrofuran

2.11.2.2 Detritylierungsreaktion

Die Hydrolyse des 5'-Dimethoxy-trityl-Kations erfolgte durch Zugabe von 1 ml Detritylierungslösung* für 40 Sek.. Die orangefarbige Lösung wurde abgesaugt und das Trägermaterial insgesamt 4 mal mit je 0.5 ml der gleichen Lösung gewaschen. Die Detritylierungslösungen wurden vereinigt und bis zum Abschluß der Synthese zur Bestimmung des Syntheseverlaufes aufbewahrt. Das Trägermaterial wurde mit Nitromethan (3 x 1 ml) und Acetonitril gewaschen (1 x 1 ml) und mit 3 x 0.5 ml H_2O-freiem Acetonitril ("DNA-grade") von Wasser befreit.

*Detritylierungslösung:

3 % (w/v) Trichloressigsäure,
1 % (v/v) Methanol in Nitromethan

2.11.2.3 Kondensationsreaktion

Zur Trocknung des Trägermaterials wurde der Reaktionsraum für 2 Min. mit Argon ausgeblasen. 150 µl der entsprechenden 0.2 M Amiditlösung in H_2O-freiem Acetonitril wurden mit 180 µl 0.5 M Tetrazol (in H_2O-freiem Acetonitril gelöst) gemischt und in das Reaktionsgefäß überführt. Nach 4 Min. Reaktionszeit wurde abgesaugt und mit 1 ml Acetonitril gewaschen.

2.11.2.4 Oxidationsreaktion

Die neu gebildete Phosphittriester-Bindung wurde durch Zugabe von ca. 1 ml Jodlösung* für 1 Min. oxidiert. Nach dem Absaugen der Lösung wurde das Trägermaterial mit Acetonitril bis zur Farblosigkeit gewaschen (ca. 5 mal mit 1 ml).

* Jodlösung: 0.1 M J_2 in H_2O/2.6-Lutidin/Tetrahydrofuran (1:10:40)

2.11.2.5 Abschluß des Synthese-Zyklus bzw. vorzeitige Beendigung

Die angeführten Reaktionen wurde solange durchlaufen, bis das letzte Nukleosid an die am Träger wachsende Kette ankondensiert war. Nach Abschluß des letzten Oxidationsschrittes wurde das Trägermaterial dann entweder mit Nitromethan (3 x 1 ml) gewaschen und detrityliert (vgl. 2.15.2.2) oder mit Acetonitril (5 x 1 ml) (wenn die Trityl-Gruppe nicht abgespalten wurde (vgl. 2.16.2)). Weiterhin wurde mit Methanol (3 x 1 ml) und Diethylether (3 x 1 ml) gewaschen, und das Trägermaterial wurde luftgetrocknet. Da die Kondensationsausbeuten nicht quantitativ bestimmt wurden, wurde eine Synthese vorzeitig abgebrochen, wenn die aufgefangene Lösung nach der Detritylierung keine erkennbare Orangefärbung mehr aufwies.

2.11.3 Abspaltung der Schutzgruppen und Freisetzung der Oligodeoxyribonukleotide

Die Abspaltung der Schutzgruppen (vgl. Sproat und Gait, 1984) des am Träger synthetisierten Oligonukleotids und die Umwandlung zum biologisch aktiven DNA-Molekül erfolgte in 4 weiteren Arbeitsschritten.

2.11.4 Umwandlung der Phosphotriester-Bindungen in Phosphodiester-Verknüpfungen

Die an den Verbindungen zwischen den Nukleotiden verbliebenen Methoxygruppen wurden durch Hydrolysereaktion mit dem nukleophilen Thiophenolat-Anion abgespalten. Das Trägermaterial wurde hierzu mit 1 ml Thiophenol/Triethylamin/Dioxan (1:2:2) bei Rt. für 45 Min. inkubiert und gründlich mit Dioxan (4 x 5 ml) gewaschen. Nach 4 Waschschritten mit je 1 ml Methanol und 3 ml Diethylether wurde das Trägermaterial luftgetrocknet.

2.11.5 Abspaltung der Basenschutzgruppen und Freisetzung der Deoxyoligoribonukleotide vom Trägermaterial

Das Abspalten der Deoxyribonukleotide vom Träger erfolgte für 2½ Std. bei Rt. mit 1 ml 25% (w/v) Ammoniaklösung. Die Lösung über dem Trägermaterial wurde abgehoben, mit 1 ml 25% (w/v) Ammoniak versetzt und zur Hydrolyse der Basenschutzgruppen der in Lösung befindlichen Polynukleotide bei 55 °C über Nacht inkubiert. Die Flüssigkeit wurde erkalten gelassen, und nach Entweichen des meisten Ammoniaks aus der Lösung wurde das DNA-Material durch Gefriertrocknen aufkonzentriert und in 0.5 ml H_2O wieder aufgenommen. Benzamide wurden durch Extraktionen 3 x mit 0.5 ml n-Butanol (H_2O gesättigt), 2 mal mit 1 ml Diethylether entfernt, und es wurde lyophilisiert. Die Proben wurden abschließend in 0.1-0.3 ml H_2O gelöst und zur Bestimmung der Ausbeute bei 260 nm gemessen.

Anmerkung: Das bei der Rückmutation der EcoRI Restriktionsschnittstelle (vgl. 3.2.3) verwendete Oligonukleotid wurde nach gleichen Prinzipien mit dem "DNA-synthetizer" (Applied Bio Systems) hergestellt und als nicht detritylierte basenentschützte Oligonukleotidmischung erhalten.

2.12 Reinigung von Desoxyoligoribonukleotiden

2.12.1 Auftrennung auf PAA-Harstoff Gelen

Die Trennung des gewünschten DNA-Syntheseproduktes von kürzeren Syntheseprodukten erfolgte im Falle der detritylierten Oligonukleotide auf denaturierenden vertikalen Polyacrylamidgelen (40 cm lang, 30 cm breit, 0.4 mm dick) durch Elektrophorese.

Zusammensetzung der Gellösung:

20 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (38g:2g)
7 M Harnstoff
100 mM Tris-Borat pH 8.3
1 mM EDTA
0.06 % (v/v) TEMED
0.06 % (w/v) Ammoniumperoxidisulfat

Jeweils 2.5-4.0 A_{260nm} des Oligonukleotid-Gemisches wurden pro Gelspur in 20 µl gesättigter Harnstofflösung auf das Gel aufgetragen. Als Laufmarker diente ein Gemisch aus 0.1% (w/v) Xylencyanol, 0.1% (w/v) Bromphenolblau in gesättigter Harnstofflösung, das in je einer Gelspur am linken und rechten Gelrand ohne Proben aufgetragen wurde. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 30 W bis, der Xylencyanol Farbstoff ca. 15 cm gelaufen war. Die Produktbande wurde mit UV-Licht (302 nm) identifiziert und aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution aus dem Gel erfolgte mit 0.5 M Ammonium-Acetat pH 7 + 10 mM $MgCl_2$ über Nacht bei 37 °C. Es folgte die Präzipitation des Oligonukleotides mit 3 Volumina absolutem Ethanol bei -80 °C über Nacht.

2.12.2 Reinigung von Oligonukleotiden durch Hochdruckflüßigkeitschromatographie (HPLC)

2.5-10 A_{260nm} eines Oligonukleotidgemisches mit vorhandenen Trityl-Schutzgruppen wurden auf einer ODS-Säule mit einem Gradienten von 15% (v/v) bis 30% (v/v) Acetonitril in 100 mM Triethylamin-Acetat(TEAAc)-Puffer, pH 7.4, wie von Fritz et al. (1978) beschrieben aufgetrennt. Aus den Fraktionen des Produktgipfels wurde das Oligonukleotid durch Gefriertrocknung gewonnen, die Tritylgruppe wurde durch Inkubation (20 Min. bei Rt.) in 80% (v/v) Essigsäure entfernt und das Oligonukleotid nach erneuter Gefriertrocknung und Lösen in 200 µl H_2O durch Ethanol-Präzipitation (vgl. 2.6.6) bei -80 °C über Nacht vom Tritanol-Ion befreit.

2.12.3 Kontrolle der Reinheit von Oligodesoxyribonukleotiden

Die gereinigten Oligodeoxyribonukleotide wurden wie von Maniatis et al. (1982) beschrieben mit T4-Polynukleotidkinase und $\gamma[^{32}P]$-ATP am 5'-Ende markiert, und ihre Reinheit wurde durch das Vorhandensein einer radioaktiv markierten Bande auf PAA-Harstoffgelen (vgl. 2.15.3) nach Autoradiographie (ca. 30-90 Min. bei Rt.) nachgewiesen. Die Bestätigung der Sequenz erfolgte lediglich indirekt nach erfolgreicher Mutagenese des gewünschten Genbereichs durch DNA-Sequenzierung des vom Oligonukleotid abgedeckten Bereichs.

2.13 Stellenspezifische Mutagenese ("site-directed mutagenesis") mit Deoxyoligoribonukleotiden

Die Erzeugung von definierten Punktmutationen innerhalb des infC Gens wurde mit Hilfe der "gapped-duplex"-Methode (Kramer et al., 1984) durchgeführt. Der für die Mutagenese wichtige geöffnete Heteroduplex ("gapped-duplex") in dessen offenen Einzelstrangbereich das mutagene Oligonukleotid gebunden wird, wurde aus M13mp9 (Messing, 1983) ss-DNA und M13mp18 (Norrander et al., 1983) RF-DNA gebildet. Der zu mutagenisierende Genbereich wurde in mp9 kloniert und die aus den Klonen isolierte ss-DNA zur Bildung der "gapped-duplex"-Form mit der mit EcoRI + HindIII linearisierten RF-Form von mp18 wie beschrieben (Kramer et al., 1984) verwendet. Für die Mutagenese wurden jeweils 0.02 A_{260nm} pro 325 ng ungereinigte "gapped-duplex"-Form eingesetzt. Die weitere biologische Selektion der Mutanten erfolgte wie beschrieben (Kramer et al., 1984) mit den Bakterienstämmen BMH 78-11 mutS und JM105 (vgl. Tab.1), wobei JM105 als Rezipient für die Vermehrung und Anreicherung der nicht supE-abhängigen mp18-Phagen verwendet wurde.

2.14 Nachweis der Initiationsfaktoren

2.14.1 Analyse in PAA-SDS-Gelen

Zum qualitativen Nachweis der Überproduktion von Initiationsfaktoren auf PAA-SDS-Gelen wurden zum Nachweis von B. stearothermophilus IF2 die Zellen von 1.5 ml induzierter Kultur (vgl. 2.6.8.6) sedimentiert (3 Min., Minifuge) und in 80 µl SDS-Probenpuffer* suspendiert. Die Zellen wurden darin 10 Min. bei 55 °C inkubiert und anschließend 5 Min. bei 100 °C gekocht. Nach dem Abzentrifugieren nicht gelöster Bestandteile (12000 UpM, 5 Min., Eppendorfzentrifuge) wurden vom Überstand 10-20 µl auf 7.5% (w/v) PAA-SDS-Gelen aufgetrennt (vgl. 2.9.2.1).

Zum qualitativen Nachweis von E. coli IF3 wurde eine partielle Aufreinigung durchgeführt, da in dem Molekulargewichtsbereich von IF3 zu viele Proteine im Gel wandern und eine Überproduktion bei Auftrennung der gesamten zellulären Proteine nicht sichtbar war. Hierzu wurde im wesentlichen eine Abänderung des ersten Aufreinigungsschrittes für die präparative Reinigung von Initiationsfaktoren (Pawlik et al., 1981) durchgeführt. Etwa 1.5-2.5 g induzierte Zellen wurden mit dem 1½fachen des Frischgewichtes Aluminiumoxid im Mörser aufgeschlossen. Der Zellbrei mit Alumimiumoxid wurde mit 7 ml NB-Puffer** aus dem Mörser in Zentrifugenröhrchen überführt und für 35 Min. bei 13000 UpM (Sorvall SA600) zentrifugiert. Die NH_4Cl-Konzentration wurde im geklärten Überstand auf 1 M eingestellt und die Lösung für 16 Std. bei 36000 UpM und 4 °C (Beckman 50Ti-Rotor) zentrifugiert (S100-Überstand). Es wurde die NH_4Cl-Konzentration im S100-Überstand auf 100 mM NH_4Cl in BA-Puffer*** durch Dialyse abgesenkt und die Lösung auf eine P.-Cell.-Säule geladen (P.-Cell. equilibriert in 100 mM NH_4Cl in BA-Puffer). Die P.-Cell.-Säule (gepackt auf halbe Höhe in einer Pasteur-Pipette) wurde dann nacheinander wie folgt gewaschen:

1) 7 ml 0.3 M NH_4Cl in BA-Puffer
2) 7 ml 0.5 M NH_4Cl -"-
3) 5 ml 1.0 M NH_4Cl -"-

und die Waschlösung in 1 ml Fraktionen gesammelt. Etwa 50-100 µl der Fraktion mit der höchsten A_{260nm} (in 1)-3) normalerweise Fraktion 2 oder 3) wurden auf einem 12.5% (w/v) PAA-SDS-Gel (vgl 2.9.2.1) aufgetrennt.

* SDS-Probenpuffer:
125 mM Tris-HCl pH 6.8
2% (w/v) SDS
2% (v/v) Glycerin
1% (v/v) β-Mercaptoethanol

** NB-Puffer:
10 mM Tris-HCl pH 7.7
10 mM Mg-Acetat
60 mM NH_4Cl

***BA-Puffer:
20 mM Tris-HCl pH 7.1
1 mM Na_2EDTA
10% (v/v) Glycerin

2.14.2 Quantitative Aktivitätsbestimmung der Initiationsfaktoren

Der Nachweis der IF3 Aktivität im S100-Überstand (vgl. 2.14.1) erfolgte wie von Pon und Gualerzi (1979) beschrieben durch die IF3 bedingte Freisetzung von NAc[^{14}C]Phe-tRNA aus dem 30S-polyU-Phe-tRNA ternären Komplex.

Die biologische Aktivität von in E. coli Zellen überproduziertem B. stearothermophilus IF2 erfolgte durch den Nachweis der Förderung der Bindung von f[^{3}H]Met-tRNA an den 70S- bzw. 30S-Poly(AUG)-Komplex (Pawlik et al., 1981) wie beschrieben in Brombach et al. (1986). In beiden Fällen wurde

die an den 70S- bzw. 30S-Komplex gebundene Radioaktivität durch Filtration auf Nitrozellulose gebunden, die Filter getrocknet und die gebundene Radioaktivität bestimmt (vgl. 2.6.5).

3 ERGEBNISSE

3.1 Identifizierung, Klonierung und Sequenzierung des Gens für IF2 aus B. stearothermophilus

Das Gen (infB) für den Initiationsfaktor IF2 aus E. coli (EcoIF2) wurde kloniert (Nakamura und Mizusawa, 1985) und sequenziert (Sacerdot et al., 1984). Aus der bekannten Restriktionsenzymkarte des Plasmids pYN128 (Nakamura und Mizusawa, 1985) und der DNA-Sequenz wurden zur Erzeugung von 3 DNA-Fragmenten des infB Gens für die Kreuzhybridisierung mit chromosomaler DNA aus B. stearothermophilus (B. stearo.) die Restriktionsendonukleasen SstI, SmaI und XhoI ausgewählt, deren Erkennungssequenzen alle innerhalb des Gens für E. coli IF2β lagen (vgl. 4.1) (Sacerdot et al., 1984). Hiermit sollte das Gen für den Initiationsfaktor IF2 aus B. stearo. (BstIF2) identifiziert werden.

3.1.1 Isolierung der DNA-Fragmente für die Kreuzhybridisierung

15-20 µg Plasmid-DNA von pYN128 wurden mit SstI + SmaI + XhoI + HindIII inkubiert (vgl. 2.6.13) und die entstandenen DNA-Fragmente auf einem 1.2% (w/v) "low gel temperature"-Agarosegel aufgetrennt (vgl. 2.9.1). Aus diesem Gel wurden das 790 bp lange SstI-SmaI-Fragment, das 680 bp SmaI-XhoI-Fragment und das 1040 bp XhoI-HindIII-Fragment isoliert (vgl. 2.6.15), und die Konzentration der isolierten Fragmente wurde auf einem Agarosegel bestimmt.

3.1.2 Identifizierung von kreuzhybridisierenden DNA-Fragmenten aus chromosomaler DNA von B. stearothermophilus

Je 5 µg chromosomale DNA aus B. stearo. 799 (vgl. 2.6.14) wurde mit 3 U einer Restriktionsendonuklease verdaut und die

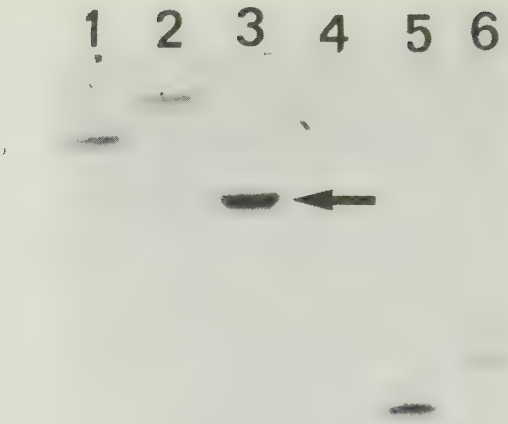

Abb.2a Autoradiogramm der Kreuzhybridisierung zur Identifizierung des Gens für BstIF2; Verwendete Restriktionsenzyme: 1: PstI, 2: EcoRI, 3: HindIII, 4: SalI, 5: ClaI, 6: SstI. Weitere Erläuterungen im Text.

erzeugten DNA-Fragmente in je einer Gelspur eines 0.7% (w/v) Agarosegeles aufgetrennt. Die DNA wurde über Nacht auf Nitrozellulosefilter übertragen, und die Filter wurden mit den zuvor isolierten und radioktiv markierten DNA-Fragmenten (vgl. 3.1.1) hybridisiert (vgl. 2.8.1).

Es wurden zunächst Bedingungen gewählt, wie sie von Mosely und Falkow (1980) beschrieben wurden. Unter diesen Bedingungen mit 25% (v/v) Formamid in der Hybridisierungslösung zeigten alle drei DNA-Fragmente (vgl. 3.1.1) starke unspezifische Hybridisierung mit den höher molekularen DNA-Fragmenten jedes Enzymverdaues, die auch nach Erhöhung der Waschtemperatur auf bis zu 55 °C und Verringerung der SSC-Konzentration (vgl. 2.8.2) auf 0.2 X SSC nicht geringer wurden.

So wurden für alle drei Fragmente Bedingungen gewählt, bei denen die Hybridisierung mit 40% (v/v) Formamid in der Hybridisierungslösung über Nacht bei 37 °C durchgeführt wurde. Nach der Hybridisierung wurden die Filter zunächst für 15 Min. bei 37 °C in gleicher Lösung mit 40% (v/v) Formamid und anschließend einmal in 2 X SSC, 0.1% (w/v) SDS bei 37 °C und zweimal für 30 Min. bei 50 °C in 0.5 X SSC, 0.1% (w/v) SDS gewaschen. Abschließend wurden die Filter noch zweimal in 0.5 X SSC bei Rt. gewaschen (Brombach et al., 1986), getrocknet und autoradiographiert (vgl. 2.6.6). Die unter diesen Bedingungen durchgeführten Hybridisierungen ergaben für alle drei DNA-Fragmente spezifische Banden, die meist unabhängig von dem verwendeten radioktiv markierten Fragment mit identischen Banden der chromosomalen DNA hybridisierten (ohne Abb.) Das SstI-SmaI-Fragment zeigte jedoch die stärkste Kreuzhybrdisierung (vgl. Abb.2a) und wurde daher für die weitere Identifizierung positiver Klone ausgewählt (vgl. 4.1). Die Abb.2a zeigt das Autoradiogramm einer Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten SstI-SmaI-Fragment nach 5 Tagen Expositionszeit bei -20 °C. Der Pfeil weist auf ein ca. 6 kb großes chromosomales HindIII-Fragment, das wegen seiner Größe und der Stärke der Kreuzhybridisierung für die folgende Klonierung ausgewählt wurde.

3.1.3 Klonierung und Identifizierung des ~6 kb HindIII DNA-Fragmentes

8 µg chromosomale DNA aus B. stearo. pro Gelspur wurden über Nacht bei 37 °C mit HindIII verdaut (vgl. 2.6.11). Die DNA Fragmente wurden in 12 Gelspuren parallel auf einem 0.8% (w/v) "low temperature gel"-Agarosegel mit einem 1 kb Molekulargewichtsstandard (BRL) zu beiden Seiten aufgetrennt. Die 5-7 kb Region des Gels wurde in 10 Fraktionen geschnitten und aufgeteilt und die DNA aus dem Gel extrahiert (vgl. 2.6.15). Je 1/10 der DNA jeder eluierten Fraktion (etwa 200 ng) wurden auf einem 0.7% (w/v) Agarosegel erneut aufgetrennt und die DNA wie beschrieben auf Nitrozellusosefilter überführt. Das Filter wurde unter Bedingungen (wie oben beschrieben) mit dem SstI-SmaI-Fragment des E. coli infB hybridisiert. Nach Autoradiographie wurde die Fraktion, in der sich das kreuzhybridisierende Fragment in höchster Konzentration befand, eindeutig identifiziert und diese Fraktion für die weitere Klonierung eingesetzt (ohne Abb.).

Als geeigneter Vektor für die Klonierung wurde pACYC177 (Chang und Cohen, 1978) wegen seiner resistenzinaktivierenden einzelnen HindIII-Schnittstelle im Kanamycin-Gen ausgewählt. Etwa 2 µg Plasmid-DNA wurden mit HindIII linearisiert und die Enden dephosphoryliert (Maniatis et al., 1982). 200 ng Vektor-DNA und 500 ng DNA der Fraktion mit dem kreuzhybridisierenden HindIII-Fragment wurden legiert (vgl. 2.6.10), und E. coli DH1 Zellen wurden mit dem Ligationsansatz transformiert (vgl. 2.6.9). Ampicillin resistente Transformanten wurden im "replica-plating"-Verfahren (Lederberg, 1952) auf Kanamycin-Sensitivität getestet. Ampicillin resistente und Kanamycin sensitive Transformanten wurden in 10 ml Übernachtkulturen mit Ampicillin mit 5 Klonen pro Kultur gemischt für die Plasmidisolierung (vgl. 2.6.10) angezogen. Von der isolierten Plasmid-DNA aus jedem "pool" wurden 1.5 µg mit HindIII verdaut und auf 0.7% (w/v) Agarosegelen

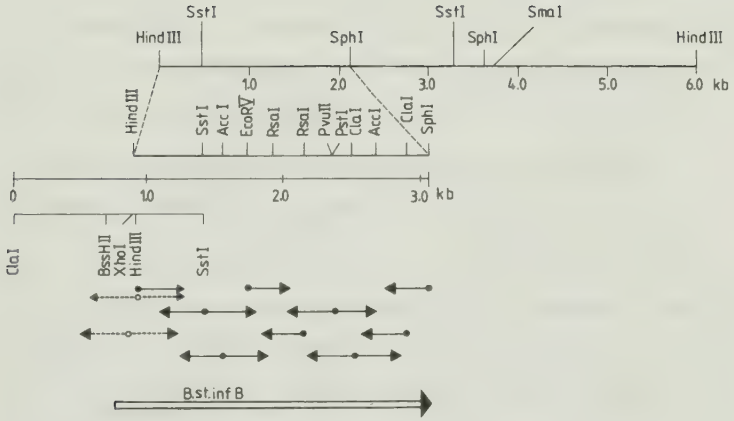

Abb.2b Restriktionskarte des 6 kb HindIII-HindIII-Fragmentes mit dem 2.2 HindIII-SphI-Fragment. Im unteren Teil das 1.4 kb ClaI-SstI-Fragment (vgl. 3.1.5) und die Sequenzierungsstrategie für das Gen des BstIF2 (offener Pfeil am unteren Rand zeigt Lage und Richtung des Gens). Weitere Erläuterungen im Text.

aufgetrennt. Die chromosomale DNA der insertierten B. stearo. 6 kb HindIII-Region wurde zusammen mit der Vektor-DNA auf Nitrozellulosefilter überführt und wie oben beschrieben mit radioktiv markierter E. coli SstI-SmaI-Fragment-DNA hybridisiert. Aus 60 "pools" zu je 5 Klonen (300 Einzelklone) konnten 3 kreuzhybridisierende Fragmente identifiziert werden, die in jedem "pool" in gleicher Weise

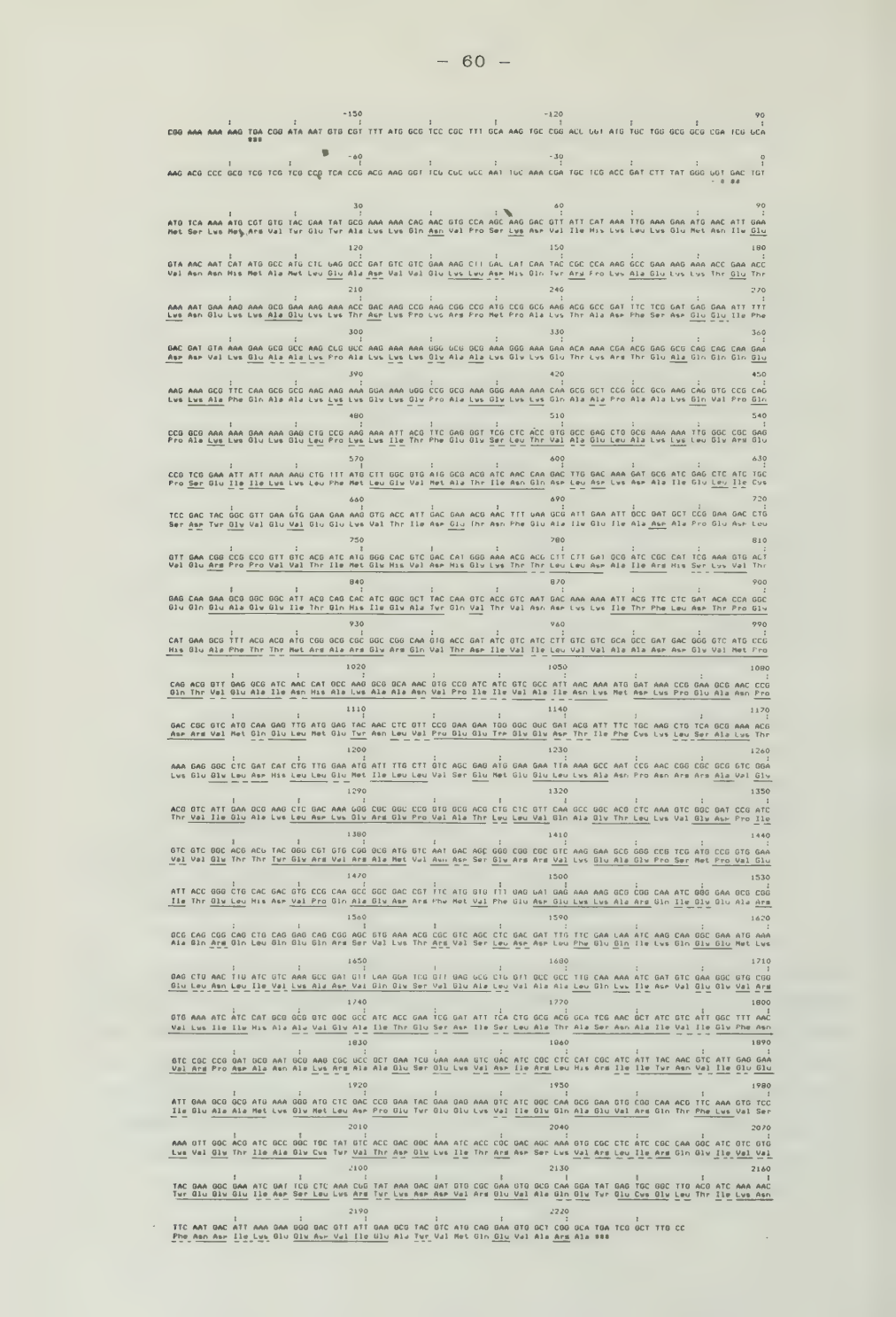

Abb.3 DNA-Sequenz und Primärsequenz des BstIF2. Identische Aminosäuren verglichen mit EcoIF2β sind durchgezogen unterstrichen, konservativ ausgetauschte sind gestrichelt unterstrichen Weitere Erläuterungen im Text.

durch Hybridisierungstest der Einzelklone identifiziert wurden. Die insertierten Fragmente aller drei Klone wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen analysiert (vgl. Abb.2b) und als identisch nachgewiesen, wobei alle drei Fragmente auch die gleiche Orientierung im Vektor aufwiesen (ohne Abb.).

3.1.4 Subklonierung und DNA-Sequenzierung des ~2.2 kb HindIII-SphI-Fragmentes

Das 6 kb HindIII-Fragment wurde der Analyse mit verschiedenen Restriktionsenzymen (vgl. Abb.2b) unterzogen, und die erzeugten Restriktionsfragmente wurden erneut mit allen drei (vgl. 3.1.1) isolierten radioaktiv markierten DNA-Fragmenten des E. coli infB Gens auf Kreuzhybridisierung (vgl. 3.1.2) getestet. Es wurde nachgewiesen, daß alle 3 Fragmente mit dem etwa 2.2 kb großen HindIII-SphI-Fragment hybridisierten, und dieses Fragment wurde für die DNA-Sequenzierung in beiden Orientierungen (d.h. mp18 und mp19) (Messing, 1983) in M13 kloniert. Die Auswertung der Sequenzgele (vgl. 2.10.3) und die Übersetzung der DNA-Sequenz in Aminosäuren des in mp19 klonierten HindIII-SphI-Fragmentes ergaben deutliche Homologie (vgl. Abb.3) zur C-terminalen Aminosäuresequenz des E. coli IF2 (Sacerdot et al., 1984). Die SphI-Schnittstelle wurde 16 bp unterhalb ("downstream") des 3'-Endes (TGA-Stopkodon) des Gens für BstIF2 lokalisiert (vgl. Abb.2b und 3). Bei der Auswertung der Sequenzdaten von der 5'-gelegenen HindIII-Schnittstelle konnte keine Homologie zur bekannten Sequenz des E. coli IF2 gefunden werden. So wurde die in Abb.2b dargestellte Sequenzierungsstrategie zur Sequenzierung des gesamten ~2.2 kb großen Fragmentes entwickelt, wobei zunächst nur die PstI-Schnittstelle über Restriktionsanalyse ermittelt wurde. Alle weiteren Subklo-

nierungen für die Herstellung der sequenzierten kleineren DNA-Fragmente wurden auf die Computer-Analyse der Teilsequenzen (Einzelgele) gestützt; d.h. die in Abb.2b angeführten Restriktionsschnittstellen wurden mit dem Rechner in der DNA-Sequenz der Einzelgele vorhergesagt, durch Restriktionsenzymverdau bestätigt und die erzeugten Fragmente für die weitere Subklonierung und Sequenzierung in M13 verwendet. Mit Ausnahme der in Abb.2b für das HindIII-SphI-Fragment angeführten RsaI-Schnittstellen (im Fragment befinden sich noch zwei weitere bei 2070 bp und 2196 bp in Abb.3) sind alle Schnittstellen vollständig aufgeführt. Da die Abbildung nur Schnittstellen berücksichtigt, die als Ausgangspunkte (gefüllte Kreise) für Sequenzgele (durchgezogene Pfeile) dienten, wurden weitere Schnittstellen zu Gunsten der Übersichtlichkeit weggelassen, da diese der DNA-Sequenz (Abb.3) entnommen werden können. Die Länge und Richtung der Pfeile entspricht den sequenzierten Basen einer mittleren Sequenzreaktion, wobei alle sequenzierten Basen auf Gelen bei 50 °C und 68 °C (LKB-Makrophor) bestätigt wurden (Brombach et al., 1986). Die Gelläufe bei 68 °C ermöglichten dabei insbesondere die Auflösung von "Sequenzkompressionen", wie sie an G-C-reichen Sequenzen und Palindromen bei 930 bp, 1250 bp und 1295 bp (vgl. Abb.3) auftraten.

Die abschließend mit dem Programm "DATBAS" (vgl. 2.10.3) aus den (insgesamt ca. 85) Einzelgelen zusammengefügte Gesamtsequenz ("consensus") ergab ein offenes Leseraster von der HindIII-Schnittstelle bis zum TGA-Stopkodon 16 bp 5'-gelegen von der SphI-Schnittstelle (vgl. Abb.3; die SphI-Erkennungssequenz schließt sich unmittelbar an das Sequenzende an und ist nicht mit aufgeführt). Aus der DNA-Sequenz wurde eine Länge von 2110 bp für das HindIII-SphI-Fragment ermittelt. Innerhalb des 5'-terminalen Teiles dieser Sequenz wurde keine "GGAGG"-Sequenz mit einem der häufigen 3'-gelegenen Startkodone ("ribosomale Bindungsstelle"; Gold et al., 1981) gefunden. Zudem kodierte das aus der Gesamtsequenz

geschlossene Leseraster für ein Protein, das etwa 5 kDa kleiner gewesen wäre als der aus B. stearo. isolierte IF2 (Kay et al., 1976). Daher wurde angenommen, daß das isolierte HindIII-Fragment nicht den möglichen Translationsstart der mRNA sowie den N-Terminus des Proteines enthielt. Zur Bestätigung dieser Vermutung wurde daher aus B. stearo. Zellen der Proteinfaktor isoliert und die N-terminalen Aminosäuren bestimmt (Brombach et al., 1986). Der Teil der N-terminalem Aminosäuresequenz, die dankenswerterweise von Frau Dr. Wittmann-Liebold im automatischen Flüssigphasen-Proteinsequenzierer ermittelt wurde, konnte in der Sequenz des offenen Leserasters nicht aufgefunden werden. Hiermit ergab sich aus den "in vitro" Daten eine hohe Wahrscheinlichkeit dafür, daß der 5'-terminale Teil der Sequenz nicht für den Translationsstart des Proteins kodierte.

Um zu ermitteln, ob in vivo nicht doch das klonierte HindIII-SphI-Fragment die Expression eines Proteins von der Größe des BstIF2 in E. coli Zellen ermöglichte, wurde das Fragment in den Expressionsvektor pPLc2833 (Remaut et al., 1983) unter die Transkriptionskontrolle des λP_L-Promotors gebracht. Hierzu wurde das HindIII-SphI-Fragment aus dem mp18-Polylinker mit HindIII + BamHI ausgeschnitten und gereinigt. In einer Ligation wurde 1 µg Fragment-DNA mit 1.5 µg Plasmid-DNA legiert, wobei die Vektor-DNA mit BamHI linearisiert und dephosphoryliert verwendet wurde. Aus der Ligationsmischung wurden auf einem 0.8% (w/v) Agarosegel Dimere aus einem Molekül Vektor-DNA mit einem Molekül Fragment-DNA gereinigt, die Enden der gereinigten Dimere wurden zu stumpfen Enden umgewandelt (vgl. 2.6.17), und die Moleküle wurden mit Ligase zu ringförmigen Molekülen geschlossen. Mit dieser Ligationsmischung wurden Zellen von E. coli K-12ΔH1Δtrp (vgl. Tab.1) transformiert und die Plasmide Ampicillin-resistenter Transformanten isoliert. Hieraus wurden mit Restriktionsenzymanalyse mit EcoRI + SstI diejenigen rekombinanten Plasmide ermittelt, bei denen das Leseraster in richtiger Orientierung (mit der aufgefüllten HindIII-Schnittstelle zur EcoRI-Schnittstelle des Polylinkers)

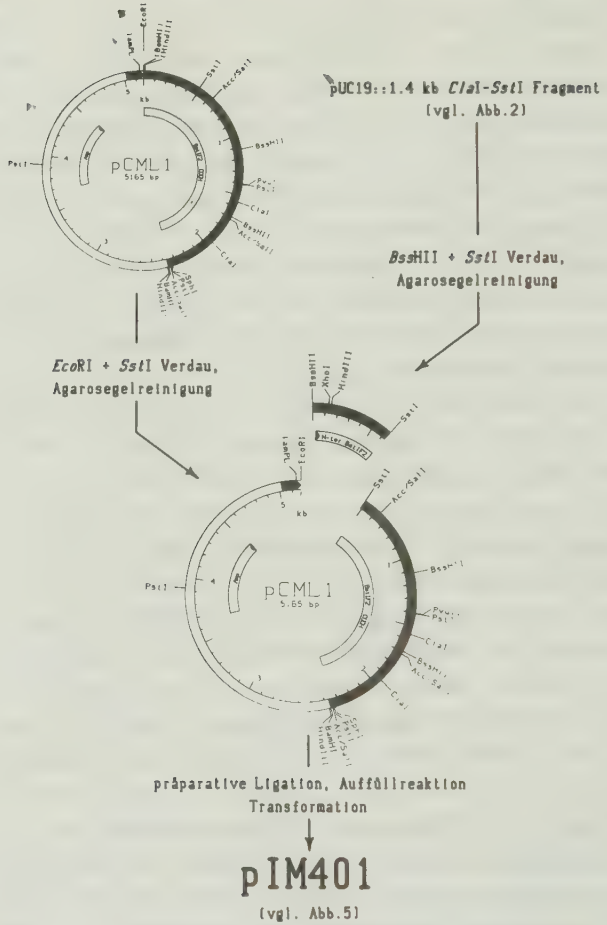

Abb.4 Rekonstitution des Gens für BstIF2 unter Transkriptionskontrolle des λP_L-Promotors (lamPL). Erläuterungen im Text.

in pPLc2833 unterhalb ("downstream") des λP_L-Promotors kloniert war. Zellen, die das so konstruierte Plasmid pCML1 (vgl. Abb.4) trugen, wurden induziert (vgl. 2.6.8.6), und das Gesamtprotein wurde auf 7.5% (w/v) SDS-PAA-Gelen (vgl. 2.9.2.1 und 2.14.1) aufgetrennt. Der Vergleich der Proteine aus induzierten Zellen mit denen aus nicht induzierten Zellen ergab keinerlei zusätzliche Proteinbande im Gel. Hieraus wurde geschlossen, daß von dem klonierten und sequenzierten DNAFragment *in vivo* in *E. coli* Zellen (vgl. 4.2) kein Protein exprimiert wurde.

3.1.5 Identifizierung des 5'-terminalen DNA-Fragmentes mit dem Translationsstart für BstIF2 ("chromosome walking")

Zur Identifizierung 5'-terminaler ("upstream") DNA-Fragmente wurde das HindIII-SstI-Fragment (vgl. Abb.2b) isoliert und für die homologe Hybridisierung mit chromosomaler DNA aus *B. stearo.* radioaktiv markiert. Je 5 µg chromosomale DNA wurden jeweils mit SstI und je einem zusätzlichen Restriktionsenzym wie XhoI, SalI, EcoRI, ClaI und SphI verdaut. Die DNA wurde wie oben beschrieben aufgetrennt, auf Nitrozellulosefilter übertragen, und die Filter wurden zu gleichen Bedingungen wie für die heterologe Hybridisierung mit *E. coli infB* Fragmenten (vgl. 3.1.1) mit dem radioaktiv markierten SstI-HindIII-Fragment hybridisiert. Nach Autoradiographie wurden ein SstI-XhoI-Fragment, das um etwa 40 bp größer als das SstI-HindIII-Fragment war, und ein etwa 1.4 kb großes SstI-ClaI-Fragment identifiziert. Alle weiteren DNA-Fragmente waren größer als 5 kb (ohne Abb.). Das SstI-ClaI-Fragment wurde für die Klonierung ausgewählt, da es 5'-terminal der HindIII-Schnittstelle etwa 900 bp "neue" DNA-Sequenz enthalten sollte. Dies war hinreichend DNA-Information für das noch fehlende N-terminale Stück des zu erwartenden Proteinfaktors aus *B. stearo.* und zusätzlich genug DNA-Information für eine mit dem *E. coli* IF2α ver-

gleichbare Proteinform (Sacerdot et al., 1984).

Die Fraktion der chromosomalen DNA mit dem SstI-ClaI-Fragment wurde mit Hybridisierung identifiziert (sie oben) und für die Klonierung des Fragments mit pUC19 (Yanish-Perron et al., 1985) legiert. Die Plasmid-DNA war mit AccI + SstI verdaut, da die AccI-Schnittstelle des Polylinkers in pUC19 zu ClaI komplementäre "GC"-Enden erzeugt. Nach Transformation von JM103 (vgl. Tab.1) mit dem Ligationsansatz wurden Ampicillin-resistente Transformanten mit der "Kolonie-Hybridisierungs"-Technik (Maniatis et al., 1982) getestet, und es konnten 20 Klone (aus 450) identifiziert werden, die eine positive Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten SstI-HindIII-Fragment zeigten. Die Plasmid-DNA dieser Klone wurde isoliert und mit SstI, HindIII, XhoI und EcoRI in Restriktionsanalysen getestet (ohne Abb.). Nur 1 Klon enthielt ein Plasmid, das ein 1.4 kb großes SstI-EcoRI-Fragment insertiert hatte (die EcoRI-Schnittstelle im Polylinker des pUC19-Vektors mußte zur Analyse verwendet werden, da sie 5'-terminal zur ClaI-AccI-Fusionssequenz lag, die von keiner der beiden Endonukleasen erkannt werden konnte). Die Restriktionsanalyse dieses DNA-Fragmentes bestätigte auch die HindIII- und XhoI-Schnittstelle an der erwarteten Position (vgl. Abb.2b). Von diesem DNA-Fragment wurde zunächst ausgehend von der HindIII- und der XhoI-Schnittstelle nur die in Abb.2b gekennzeichnete Region sequenziert (offene Kreise, gestrichelte Pfeile).

Bei der Analyse der Sequenzdaten wurde die XhoI-Schnittstelle 21 bp 5'-terminal der HindIII-Schnittstelle lokalisiert. Weiterhin wurde 123 bp 5'-terminal der XhoI-Schnittstelle (vgl. Abb.3 Position 1) ein ATG-Startkodon gefunden, dem bei Übersetzung der DNA-Sequenz in eine Aminosäuresequenz diejenigen Aminosäuren folgten, die als N-terminale Sequenz für den aus B. stearo. isolierten Proteinfaktor ermittelt wurden. 4 bp 5'-terminal des ATG-Startkodon wurde eine potentielle ribosomale Bindungsstelle mit 7 Basen komplementär zum 3'-Ende der 16S-rRNA aus B. stearo gefunden.

Diese RBS der mRNA enthielt ein UGA-Stopkodon und eine atypische G-U-Basenpaarung der SD-Sequenz. Für die mögliche Wechselwirkung zwischen rRNA und komplementärer Sequenz auf der mRNA wurde ein Energiewert von $\Delta G = -16.6$ kcal/mol berechnet (Hager und Rabinowitz, 1985). Dieser Wert lag im Bereich der durchschnittlichen Wechselwirkung für Gram-positive ribosomale Bindungsstellen (Hager und Rabinowitz, 1985). 5'-terminal des ATG-Startkodon wurde eine BssHII-Schnittstelle in der Sequenz lokalisiert (vgl. Abb.2b und Position -45 Abb.3) und ihre Lage durch Restriktionsanalyse bestätigt. Die BssHII-Schnittstelle wurde für die Rekonstitution des vollständigen Leserasters unter Transkriptionskontrolle des λP_L-Promotors und für die folgende *in vivo* Expression des BstIF2 in *E. coli* Zellen verwendet.

3.1.6 Expression des BstIF2-Proteins in *E. coli* Zellen

Von dem in pUC19 klonierten SstI-ClaI-Fragment wurde das BssHII-SstI-Fragment (vgl. Abb.2b und Abb.4) wie vorher beschrieben isoliert. Aus dem in 3.1.4 in pPLc2833 klonierten unvollständgen HindIII-SphI-"Leseraster"-Fragment (vgl. Abb.4 pCML1 : BstIF2-COOH) wurde durch Restriktionsenzymverdau mit EcoRI + SstI und anschließende Gelreinigung das 5'-terminale EcoRI-SstI-Fragment entfernt. Hierbei wurde die 5'-terminal im Polylinker gelegene EcoRI-Schnittstelle verwendet, weil durch die Ligation der aufgefüllten HindIII-Schnittstelle mit der aufgefüllten BamHI-Schnittstelle des pPLc2833-Polylinkers beide Erkennungssequenzen verlorengegangen waren (sie sind daher in Abb.4 in Klammern aufgeführt).

In einer Ligation wurden dann 1 µg dephosphoryliertes SstI-EcoRI-Vektorfragment (mit dem 3'-terminalen Teil des Leseraster; vgl. Abb.4) mit 1 µg BssHII-SstI 5'-terminales Fragment des Leserasters (vgl. N-ter BstIF2; Abb.4) legiert und wie in 3.1.4 beschrieben Dimere aus beiden Molekülen auf dem Agarosegel gereinigt und isoliert. Die nicht zueinander

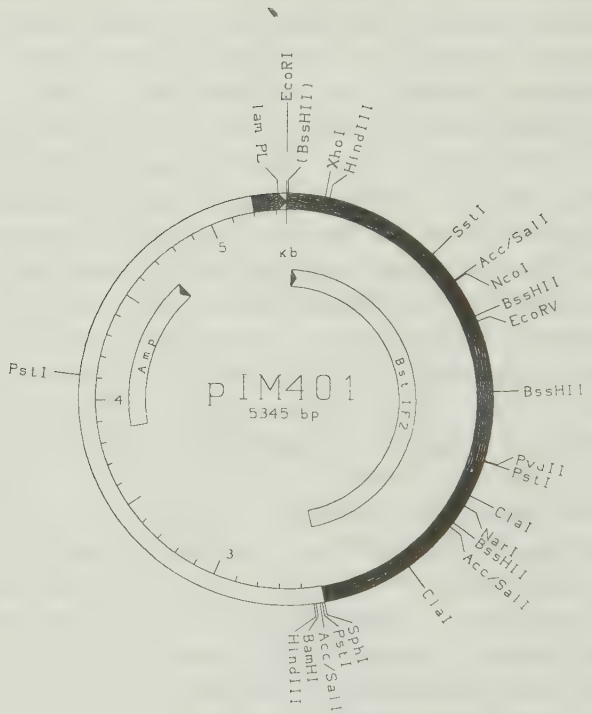

Abb.5 Kreisförmige Karte des Plasmids pIM401 mit dem Gen für BstIF2 (BstIF2) unter der Transkriptionskontrolle des λP_L-Promotors. Weitere Erläuterungen im Text.

passenden BssHII- und EcoRI-Enden dieser Dimere wurden aufgefüllt und die Moleküle mit Ligase zum Ring geschlossen. Nach Transformation von K-12ΔH1Δtrp wurden die Plasmide Ampicillin-resistenter Transformanten isoliert und der Restriktionsanalyse mit EcoRI + SstI unterzogen. Bei 3 aus 5 Transformanten konnte das 670 bp lange BssHII-SstI-Fragment

nachgewiesen werden. Hierbei wurde für die Restriktionsanalyse EcoRI an Stelle von BssHII verwendet, da bei der Ligation der aufgefüllten EcoRI- mit der aufgefüllten BssHII-Schnittstelle das 5'-GC-Basenpaar der aufgefüllten BssHII-Schnittstelle zwar die EcoRI-Schnittstelle des Polylinkers wiederherstellte, die BssHII-Schnittstelle umgekehrt aber nicht wiederhergestellt wurde (vgl Abb.5; die BssHII-Schnittstelle ist daher in Klammern gesetzt, um ihre

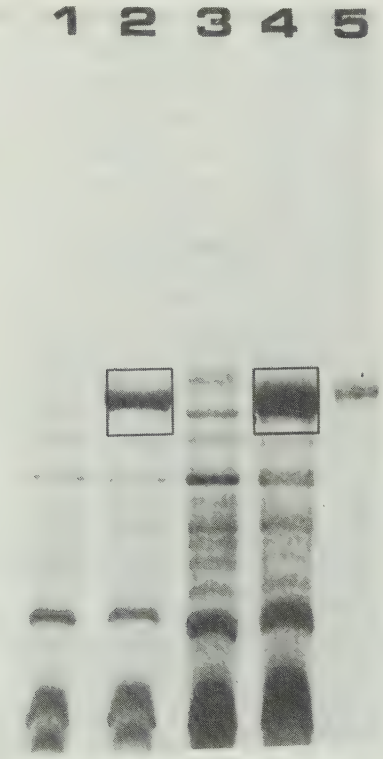

Abb.6 Überproduktion von BstIF2 (Rahmen) in Zellextrakten aus K-12ΔH1Δtrp/pIM401. 1,2: 180 µl Zellen; 3,4: 360 µl Zellen. 1,3: nicht induziert; 2,4: induziert. 5: 3 µg IF2 aus B. stearo. 799.

Lage im Vergleich mit Abb.2b zu kennzeichnen). Die Abbildung 5 zeigt die vollständige Karte des Plasmids pIM401 mit dem Gen für BstIF2 (innerer Marke; ▶: Richtungsagabe N-terminus→ C-Terminus), das 3'-terminal des λP_L-Promotors (lamPL, gefüllter Pfeil im Außenkreis) kloniert ist. Die

Restriktionsenzyme für die eingesetzte B. stearo. DNA (gefüllter Außenkreis) sind wie angegeben (Acc: AccI) und wurden der DNA-Sequenz entnommen. Die Lage und Richtung des Ampicillin Gens (innere Marke mit Amp und ▶) sowie die Restriktionsenzymschnittstellen für die Vektor-DNA (offener Außenkreis) wurden der Karte von pPLc2833 (pPLc28: Remaut et al., 1981; pPLc2833: Remaut et al., 1983) entnommen.

Zellen von K-12ΔH1Δtrp/pIM401 wurden induziert und die Extrakte des gesamten zellulären Proteins auf 7.5% (w/v) SDS-PAA-Gelen aufgetrennt (vgl. 2.9.2.1 und 2.14.1). Dabei konnte nachgewiesen werden, daß diese Zellen in vivo ein Protein in großer Menge (≧0.5 µg/mg Zellfrischgewicht) exprimierten, das in seiner Wanderung im Gel mit dem aus B. stearo. Zellen isolierten IF2 identisch war (vgl. Abb.6). Dabei waren die Zellen mit pIM401 nach Induktion morphologisch und im Wachstumsverhalten nicht von den Kontrollen mit dem Vektorplasmid pPLc2833 zu unterscheiden. Hierdurch kam die Frage auf, ob der überproduzierte Faktor überhaupt biologisch aktiv war.

3.1.7 Nachweis der biologischen Aktivität von BstIF2 aus E. coli Zellen

Der aus induzierten Zellen von K-12ΔH1Δtrp/pIM401 isolierte und gereinigte BstIF2 wurde in seiner Aktivität mit 30S- oder 70S-poly(AUG)-Komplexen aus E. coli und 30S-poly(AUG)-Komplexen aus B. stearo. getestet (vgl. 2.14.2) (Brombach et al.,1986).

Die Aktivität wurde dabei mit dem E. coli IF2 (EcoIF2) verglichen, und es wurde gefunden, daß der in E. coli Zellen überproduzierte und aus ihnen isolierte Faktor im in vitro Testsystem aktiv war. Die Aktivität von BstIF2 war dabei deutlich höher mit 30S-Komplexen aus B. stearo., der Faktor zeigte aber auch noch Aktivität mit E. coli 30S-Komplexen. Im umgekehrten Fall war EcoIF2 mit 30S-Komplexen aus B. stearo. nahezu inaktiv war. Weiterhin wurde die Aktivität

von BstIF2 weniger als die von EcoIF2 von IF1 aus E. coli stimuliert (vgl. Tab.2 und 4.2).

Tabelle 2: Aktivitätsbestimmung von BstIF2[a]

Zugegebene Initiations-faktoren	Poly(AUG)-abhängige Bindung von f[^{3}H]Met-tRNA (cpm) an		
	E.coli 30 S	E.coli 70 S	B.stearothermophilus 30 S
keine	9812	13021	3344
BstIF2	36996	39368	23527
BstIF2+EcoIF1	43056	55114	25007
EcoIF2	50339	29911	5873
EcoIF2+EcoIF1	76731	56855	13263

[a]Die Reinigung der Initiationsfaktoren erfolgte wie von Pawlik et al. (1981) beschrieben. Die Reaktion wurde in 50 µl eines 50 mM Tris-HCl Puffer, pH 7.7 mit 100 mM NH_4Cl, 7 mM Mg-Acetat, 1 mM GTP, 1 mM DTT für 15 Min. bei 37 °C durchgeführt. Hierin wurden jeweils 30 pmol der angegebenen ribosomalen Untereinheiten mit 5 µg poly(AUG), 20 pmol f[^{3}H]Met-$tRNA_f$ (6500 cpm/pmol) und wo angegeben 3 µg E. coli bzw. B. stearothermophilus IF2 und 1.2 µg E. coli IF1 inkubiert. Die an die Komplexe gebundene Radioktität wurde durch Filtration auf Nitrozellulosefilter (vgl. 2.14.2) bestimmt. Von den angegebenen Werten wurde der Wert für die ermittelte Hintergrundradioaktivität (gleiche Reaktionsbedingungen aber ohne Poly(AUG)) abgezogen.

3.1.8 Vergleich der Aminosäuresequenzen und der Gene für BstIF2 und EcoIF2

In Anbetracht der nachgewiesenen Aktivität von BstIF2 und der hohen Expression des Gens in E. coli Zellen wurde die genetische Information mit der des IF2β aus E. coli verglichen (vgl. 4.3). Die Aminosäurezusammensetzung wies dabei

Tabelle 3 : Aminosäurezusammensetzung von BstIF2[a]

A	B	C	A	B	C			
Ala	76 (85)	10.24	Met	23 (20)	3.10	Aminosäurereste	742	(733)
Cys	4 (3)	0.54	Asn	23 (26)	3.10	M_r	82.043	(79.713)
Asp	47 (40)	6.33	Pro	29 (18)	3.91	Ladung	−2	(−17)
Glu	73 (77)	9.84	Gln	32 (30)	4.31	Lys/Arg	2.28	(0.96)
Phe	15 (13)	2.02	Arg	36 (51)	4.85	Glu/Asp	1.55	(1.9)
Gly	47 (63)	6.33	Ser	21 (35)	2.83	Thr/Ser	1.86	(0.91)
His	13 (14)	1.75	Thr	39 (32)	5.26	Gln/Asn	1.4	(1.15)
Ile	52 (42)	7.01	Val	71 (76)	9.57	Ile/Leu + Val	0.46	(0.34)
Lys	82 (49)	11.05	Trp	1 (2)	0.13			
Leu	43 (48)	5.79	Tyr	14 (11)	1.89			

[a]Die Werte in Klammern entsprechen denen für IF2β aus E. coli. A: Aminosäurerest; B: Anzahl; C: Anteil des Aminosäurerestes in mol %.

die in Tabelle 3 zusammengefaßten Unterschiede auf, wobei für BstIF2 nur eines der beiden Tryptophane (Position 1129 bp in Abb.3) erhalten blieb und ein zusätzlicher Cysteinrest vorhanden ist. Signifikante Unterschiede ergaben sich für den Gehalt an Isoleucin und die Verhältnisse Lysin/Arginin sowie Threonin/Serin (vgl. Tab.3).

Die Verteilung der Aminosäuren in der Primärsequenz (vgl. Abb.3) wies starke Homologien zwischen EcoIF2(β) und BstIF2 in den C-terminalen Zweidritteln der Moleküle auf (57% identische Aminosäurereste und 13% konservativ ausgetauschte Aminosäurereste). Das N-terminale stark hydrophile Drittel von BstIF2 zeigte weder Homologie zum äquivalenten N-terminalen Teil von EcoIF2β noch zu dem zusätzlichen N-terminalen Teil in EcoIF2α (vgl. 4.3). Insgesamt wurde für beide Proteine eine Homologie von 55% ermittelt (identische und kon-

servativ ausgetauschte Aminosäurereste). Die Homologie im Bereich zwischen 470 bp - 610 bp (vgl. Abb.3) ließ sich dabei nur herstellen, wenn in der Aminosäuresequenz von EcoIF2β zwischen 620 bp und 650 bp (bezogen auf Abb.3) eine "Leerstelle" eingefügt wurde. Die dadurch entstandene Rasterverschiebung wurde im Bereich von 500 bp (bezogen auf Abb.3) durch Einfügen einer Leerstelle in die Sequenz von BstIF2 wieder ausgeglichen (d.h. die Homologie von EcoIF2 war in diesem Bereich vom C-Terminus her verglichen um einen zusätzlichen Aminosäurerest verschoben). Besonders starke Homologie wurde zwischen beiden Sequenzen im Bereich von 730 bp - 1230 bp (vgl. Abb.3) gefunden. Dieser Bereich zeigte große Sequenzhomologie mit bisher charakterisierten GTP-bindenden Proteinen (March und Inouye, 1985). Er ent-

Tabelle 4 : Kodonbenutzung von BstIF2[a]

Phe	TTT	40	(23)	Ser	TCT	0	(34)	Tyr	TAT	29	(27)	Cys	TGT	0 (100)
	TTC	60	(77)		TCC	10	(29)		TAC	71	(73)		TGC	100 (0)
Leu	TTA	2	(0)		TCA	14	(9)	och	TAA	0	(100)	opa	TGA	100 (0)
	TTG	23	(2)		TCG	48	(6)	amb	TAG	0	(0)	Trp	TGG	100 (100)
Leu	CTT	14	(0)	Pro	CCT	0	(5.5)	His	CAT	77	(14)	Arg	CGT	8 (78)
	CTC	33	(15)		CCC	0	(0)		CAC	23	(86)		CGC	47 (22)
	CTA	0	(0)		CCA	10	(5.5)	Gln	CAA	63	(17)		CGA	3 (0)
	CTG	28	(83)		CCG	90	(89)		CAG	38	(83)		CGG	42 (0)
Ile	ATT	44	(19)	Thr	ACT	3	(34)	Asn	AAT	30	(8)	Ser	AGT	0 (0)
	ATC	56	(81)		ACC	28	(56)		AAC	70	(92)		AGC	29 (23)
	ATA	0	(0)		ACA	5	(0)	Lys	AAA	70	(78)	Arg	AGA	0 (0)
Met	ATG	100	(100)		ACG	64	(9)		AAG	30	(22)		AGG	0 (0)
Val	GTT	17	(46)	Ala	GCT	8	(24)	Asp	GAT	47	(45)	Gly	GGT	2 (51)
	GTC	45	(12)		GCC	28	(13)		GAC	53	(55)		GGC	57 (46)
	GTA	3	(18)		GCA	5	(22)	Glu	GAA	70	(84)		GGA	9 (2)
	GTG	35	(24)		GCG	59	(41)		GAG	30	(16)		GGG	32 (2)

[a]Die Angaben in Klammern entsprechen den Werten für IF2β aus E. coli.

hielt zudem die Aminosäurereste, die nach Untersuchungen von Jurnak (1985) bei EF-Tu mit GDP in Kontakt standen (für BstIF2 sind dies Lys257, Asp297, Asn351 und Asp354; Brombach et al., 1986). Ein großer Teil dieser Region war auf dem für die Identifizierung des Gens verwendeten SmaI-SstI-Fragment (vgl. 3.1.1) von infB enthalten, wodurch nachträglich die starke Hybridisierung erklärt werden kann.

Bei der DNA-Sequenz war aufgrund der gefundenen guten Translation der mRNA die Benutzung des Triplettkodes von besonderem Interesse. Hierbei wurden die in Tabelle 4 zusammengefaßten Unterschiede zu EcoIF2β (Werte in Klammern) gefunden, wobei auffällt, daß bestimmte Kodone, die in einem Organismus selten benutzt wurden, im anderen häufig auftraten (z.B. CTT, ACG, CGG und GGG für E. coli und TCT, CGT, GGT und ACT für B. stearo.)

Tabelle 5 : Häufigkeit der Basen in den Triplettpositionen[a]

Position im Triplett	Basenzusammensetzung (%)			
	U	C	A	G
1.	8.2 (7.9)	19.1 (21.5)	30.3 (24.1)	42.3 (46.5)
2.	27.5 (26.8)	21.4 (22.1)	38.3 (33.8)	12.8 (17.3)
3.	13.6 (25.9)	30.5 (29.0)	20.1 (20.0)	35.8 (25.1)
Gesamt	16.4 (20.2)	23.7 (24.2)	29.6 (26.0)	30.3 (29.6)

[a]Die Angaben in Klammern entsprechen den Werten für IF2β aus E. coli.

Die meisten Unterschiede ließen sich mit Unterschieden in der Bevorzugung bestimmter Basen in den Positionen der Tripletts erklären. Die in Tabelle 6 zusammengefaßten Ergebnisse (signifikante Unterschiede sind unterstrichen) machten deutlich, daß in B. stearo. eine Bevorzugung von G zuungunsten von U in der dritten Position des Tripletts und eine leichte Bevorzugung von A zu ungunsten von G in der ersten und zweiten Position des Tripletts bestand. Im Gesamtvergleich der Kodonbenutzung bestätigten sich Untersuchungen von Hager und Rabinowitz (1985), wonach die Kodonbenutzung in B. stearo. weniger präferenziell als in E. coli war.

3.2 Untersuchungen zur Expression und Regulation des infC Gens aus Escherichia coli

Das Gen für den Initiationsfaktor IF3 (infC) aus E. coli wurde bei 38 Min. auf der E. coli Chromosomenkarte lokalisiert. Es wurde als Teil einer Region auf dem Chromosom mit anderen an der Translation beteiligten Genen beschrieben, zu der die Gene für die Threonyl-tRNA Synthetase (thrS), das ribosomale Protein L20 (rplT) und die Gene für die α und β Untereinheit der Phenylalanyl-tRNA Synthetase (pheS, pheT) gehören. Ausgehend von dem transduzierenden Lambda-Phagen λp2 (Springer et al., 1977b) wurden die Plasmide pHW0 (Elhardt et al., 1982) (entspricht pB1; Plumbridge et al., 1980) und pHW2 (A. Böck, pers. Mitt.) (entspricht pB5-57; Plumbridge et al., 1980) mit dem infC Gen konstruiert. Von Subklonen dieser Plasmide wurde die DNA-Sequenz (Sacerdot et al., 1982) mit der Primärsequenz des IF3-Proteins (Brauer und Wittmann-Liebold, 1977; Sacerdot et al., 1980) ermittelt. Es wurden Bedingungen veröffentlicht, unter denen IF3 in Stämmen mit zusätzlichen extrachromosomalen Kopien des infC Gens vom 2fachen bis zum 20fachen des normalen Gehaltes von Wildtyp-Zellen produziert wurde (Elhardt et al., 1982; Lestienne et al., 1982). Diese hohen Werte der Überproduktion konnten von uns mit Stämmen, die die Plasmide pHW0 und pHW2 trugen, insbesondere in großen Kulturvolumina (60 L) nicht erreicht werden. Ziel der folgenden Untersuchungen war es daher, Bedingungen zu schaffen, unter denen IF3 in großer Menge und stabil in induzierbaren Systemen produziert wird und die an der Expression des infC Gens beteiligten Vorgänge zu untersuchen.

3.2.1 Subklonierung von infC in pPLc2833

Von Plumbridge und Springer (1982) wurde beschrieben, daß die in pBR322 klonierte infC Region mit den oben beschriebenen benachbarten Genen spontan Deletionen und Veränderun-

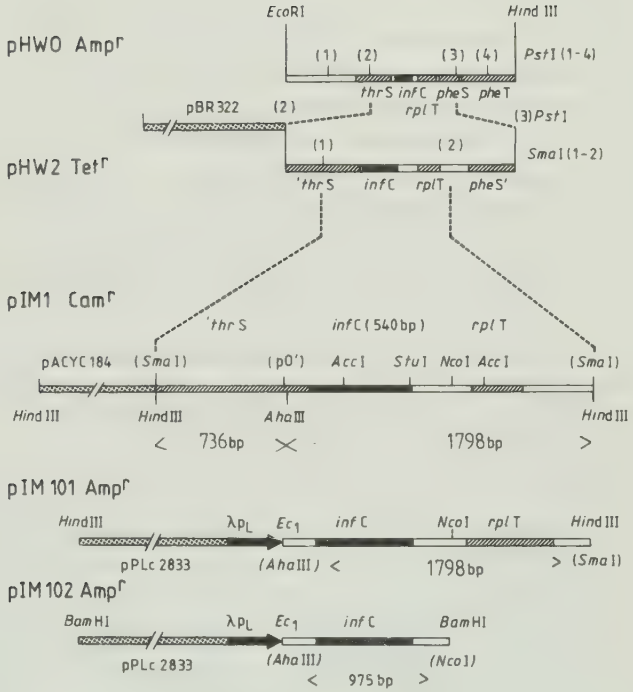

Abb.7 Subklonierung des infC Gens aus E. coli. Offene Bereiche: Zwischensequenzen; punktiert: Vektorsequenzen; schraffiert: Strukturgene; gefüllter Pfeil: Lambda Promotorfragment; Restriktion enzymschnittstellen wie angegeben; Ec$_1$: EcoRI; (vgl. Text).

gen der Genstrukturen erzeugte. Daher wurde aus Gründen der genetischen Stabilität beschlossen, das infC Gen ohne benachbarte Regionen zu subklonieren und unter die Transkriptionskontrolle des induzierbaren λP_L-Promotors zu bringen. Die Subklonierung von infC erfolgte wie in Abb.7 dargestellt ausgehend von den Plasmiden pHW0 und pHW2, die dankenswerterweise von A. Böck (München) zur Verfügung gestellt wurden. Aus pHW2 wurde das SmaI-Fragment (vgl. Abb.7) isoliert und zur Subklonierung in das Tetracyclin-Gen von pACYC184 (Chang und Cohen, 1978) an beiden Enden mit HindIII-"Linkern" (BRL) versehen (Maniatis et al., 1982). In Chloramphenicol-resistenten und Tetracyclin-sensitiven Transformanten wurde das Plasmid pIM1 mit geeigneten Restriktionsenzymen nachgewiesen (vgl. Abb.7). Die bei pIM1 in Abb.7 und auch bei den folgenden Plasmiden in Klammern aufgeführten Restriktionsenzym-Schnittstellen gingen durch Manipulationen als Erkennungsstellen für die jeweiligen Enzyme verloren, wurden jedoch zum besseren Verständnis und zur Orientierung in der DNA-Gesamtsequenz mit aufgeführt.

Da innerhalb des 736 bp HindIII-AhaIII-Fragmentes von pIM1 noch zwei mögliche Promotoren (pO und pO' (Abb.7)) für die infC Transkription identifiziert wurden (Mayaux et al., 1983), wurde das 1798 bp AhaIII-HindIII-Fragment aus pIM1 isoliert, bei dem der mögliche Promotor pO' (vgl. Abb.7) durch die AhaIII-Schnittstelle in der "-10"-Region inaktiviert wurde. Nach Ligation von EcoRI-"Linkern" am AhaIII-Ende wurde dieses Fragment in pPLc2833 in die EcoRI- und HindIII-Schnittstelle des Polylinkers kloniert, wobei als Folge der "Linker"-Addition (vgl. Abb.7 Ec_1) die Erkennungsstelle für AhaIII an der Ec_1-Schnittstelle verlorenging. Das so konstruierte Plasmid pIM101 enthielt auf der 1798 bp langen eingesetzten DNA die Strukturgene (schraffierte Bereiche in Abb.7) für IF3 (infC) und L20 (rplT). Aus pIM101 wurde das 975 bp Ec_1-NcoI-Fragment isoliert und in pPLc2833 kloniert. Hierbei wurde die Methode der "präparativen Ligation" angewendet, indem dephosphoriliertes EcoRI-

SalI-Vektorfragment mit Ec_1-NcoI-Fragment ligiert wurde und anschließend aus der Ligationsmischung Dimere aus beiden Fragmenten präparativ aus einem Agarosegel isoliert wurden. Die NcoI- bzw. SalI-Enden der Dimere wurden aufgefüllt und die Moleküle mit Ligase zum Ring geschlossen. Die Erkennungsstellen für NcoI und SalI gingen dabei verloren (Abb.7 zeigt daher pIM102 linearisiert an der BamHI-Schnittstelle des pPLc2833 Polyiinkers). Das konstruierte Plasmid pIM102 besaß als intaktes Strukturgen nur das infC Gen, das wie auch in pIM101 unter ausschließlicher Transkriptionkontrolle des induzierbaren λP_L-Promotors stehen sollte. Daher sollte der Vergleich der infC Expression von beiden Plasmiden Auskunft über den Einfluß von rplT auf die Expression von infC geben.

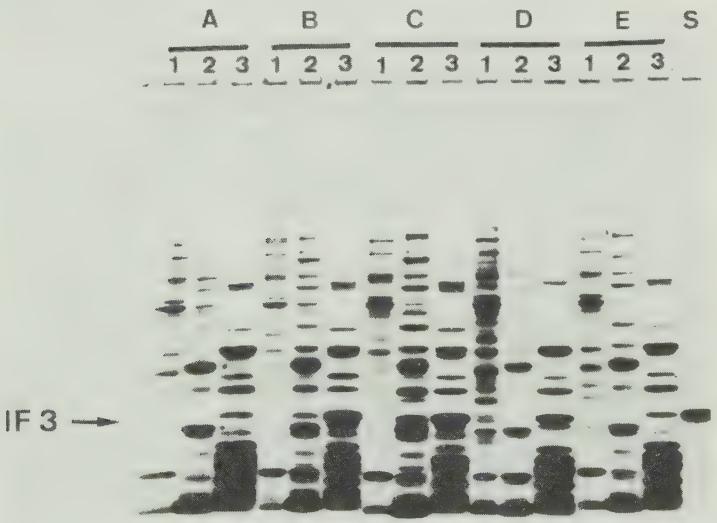

Abb.8a Produktion von IF3 in Zellen mit Wildtyp-infC Gen im induzierbaren System. 1: 0.3 M* ; 2: 0.5 M*; 3: 1 M*; A: K-12ΔH1Δtrp induziert; B: RR1/pHW0; C: RR1/pHW2; D,E: K-12ΔH1Δtrp/pIM101: D: induziert, E:nicht induziert; S: 2.5 µg IF3; * Ammoniumchlorid Konzentration der P.-Cell. Waschlösung (vgl. 2.14.1) (vgl. Text).

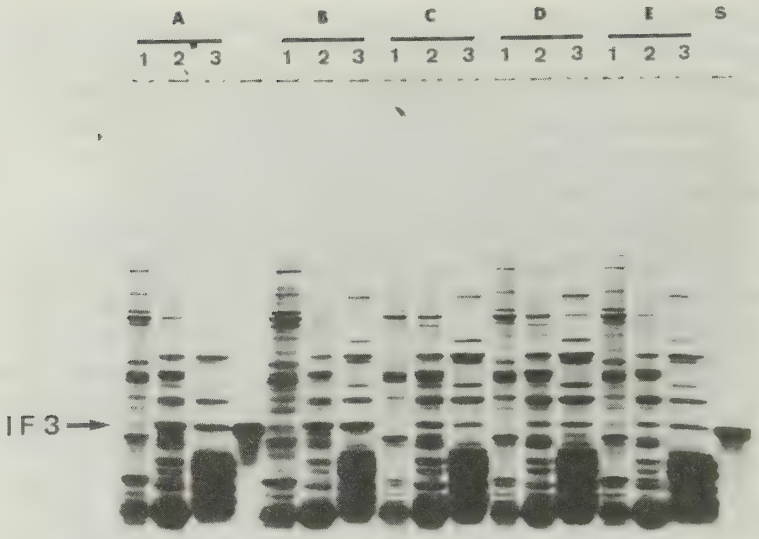

Abb.8b Einfluß von rplT auf die Produktion von IF3. A,C: K-12ΔH1Δtrp/pIM101: A: induziert, C: nicht induziert; B,D: K-12ΔH1Δtrp/pIM102: B: induziert, D: nicht induziert; E: K-12ΔH1Δtrp induziert; S: 2.5 µg IF3; 1-3: wie in Abb.8a; (vgl. Text).

3.2.2 Expression von infC im induzierbaren System

Extrakte aus Zellen mit dem Plasmid pIM101 wurden in einer ersten Analyse im 12.5% (w/v) PAA-SDS-Gelen bezüglich der Produktion von IF3 im Vergleich mit Zellen mit pHW0 und pHW2 getestet. Hierzu wurden die Zellextrakte partiell aufgereinigt und gleiche Mengen von jeder Waschlösung (50 µl aus Fraktion 2 oder 3) der P.-Cell.-Säule auf dem Gel aufgetragen (vgl. 2.14.1). Extrakte aus induzierten Rezipientenzellen des Stammes K-12ΔH1Δtrp wurden als Wildtyp-Kontrolle verwendet (Abb.8a: A). K-12ΔH1Δtrp/pIM101 wurde induziert und nicht induziert (Abb.8a: D bzw. E) analysiert, und Zellen von RR1/pHW0 (Abb.8a: B) und RR1/pHW2 (Abb.8a: C) wurden während der gesamten Wachstumszeit bei 37 °C bis zum

Zeitpunkt der Ernte von induzierten Zellen (vgl. 2.6.8.6) schüttelnd inkubiert. Beim Vergleich der relativen Mengen IF3 (Abb.8a Spuren 2 und 3 in A-E) wurde gefunden, daß die erzeugte Menge IF3 unter Transkriptionkontrolle des "starken" Lambda-Promotors in induzierten Zellen mit pIM101 etwa nur 2/3 der Menge in Zellen mit pHW0 und pHW2 betrug (vgl. 4.5). Die Menge von IF3 in nicht induzierten Zellen mit pIM101 entsprach dabei der in Wildtyp-Zellen ohne Plasmid (vgl. Abb.8a: A und E). Dadurch wurde bestätigt, daß auf den konstruierten Plasmiden in vivo kein anderer als der Lambda Promotor für die infC Expression aktiv war und dieser bei 30 °C vollständig reprimiert war (vgl. auch Abb.8b: C-E). Um einen möglichen Einfluß des 3' zu infC gelegenen rplT Gens auf die Transkription von infC zu untersuchen, wurden in einem zweiten Experiment die relativen Mengen von IF3 in Zellen mit pIM101 und pIM102 verglichen. Da kein nennenswerter Unterschied mit der Methode der halbquantitativen Gelanalyse zwischen Zellen mit pIM101 und pIM102 (vgl. Abb.8b: A und B) festgestellt werden konnte, wurde zunächst ein Einfluß von rplT bzw. dessen Genprodukt L20 auf die geringe infC-Expression im induzierbaren System ausgeschlossen.

Als weitere Gründe für die geringe infC Expression wurden deshalb in Betracht gezogen: a) Das ungewöhnliche AUU-Startkodon der IF3-mRNA verursachte eine niedrige Translationseffizienz der mRNA und/oder b) die 192 bp lange DNA-Sequenz 5'-terminal des ATT-Startkodons bis zur ursprünglichen AhaIII-Schnittstelle übte einen negativen Einfluß möglicherweise regulatorischer Art auf die Transkription von infC aus (vgl. Mayaux et al., 1983 und 4.6). Mögliche Promotormutationen im Lambda-Promotor des Vektors als Ursache für die geringe Expression wurden wegen der voneinander unabhängigen Klonierung des infC Gens in pIM101 und pIM102 (vgl. 3.2.1) mit getrennten Vektorpräparationen für unwahrscheinlich gehalten. Zudem ergab die Untersuchung verschiedener auf Induktion getesteter Einzelklone mit beiden Plasmiden das gleiche Ergebnis (ohne Abbildung).

3.2.3 Stellenspezifische Mutagenese der DNA-Region mit dem ATT-Startkodon des infC Gens

Um bestmögliche Ausgangsbedingungen für die weitere Erhöhung der Expression zu erzielen, wurde ein Oligodeoxyribonukleotid (20mer) mit der Sequenz 5' **AGGAATTCGGTATGAAAGGC**-3' manuell synthetisiert (vgl. 2.11) und gereinigt (vgl. 2.12.1), das zur Wildtypsequenz 3 Fehlpaarungen (unterstrichene Nukleotide) aufwies. Mit den beiden 5' gelegenen Fehlpaarungen sollte durch Mutagenese eine EcoRI-Schnittstelle 4 bp 5' des Startkodons eingeführt werden, die es ermöglichte, die 192 bp lange Sequenz 5' des Startkodon auf einfache Weise zu deletieren und die zugleich eine einfache Möglichkeit für die Suche nach Mutanten ("screeening")

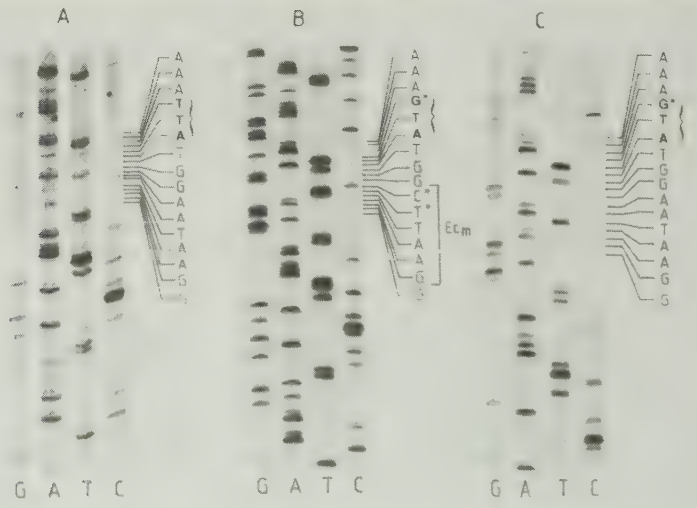

Abb.9 DNA-Sequenzen von Mutanten des infC Gens. A: Wildtyp-infC; B: Mutante mit Ec_m und ATG-Startkodon; C: Mutante mit ATG-Startkodon; *: durch stellenspezifische Mutagenese verändert; Startkodone durch Klammer gekennzeichnet. Ec_m: EcoRI-Schnittstelle durch Mutagenese eingeführt; (vgl. Text).

eröffnete. Die 3' gelegene Fehlpaarung sollte zugleich das Startkodon in das gewöhnliche ATG-Startkodon umwandeln. Für die folgende Mutagenese nach der "gapped-duplex"-Methode (vgl. 2.13) wurde das Ec_1-HindIII-Fragment aus pIM101 in M13mp9 kloniert. Aus Klonen, die dieses Fragment enthielten, wurde die ss-DNA isoliert. Diese wurde mit mp18RF-DNA, die mit EcoRI und HindIII linearisiert war, zur Heteroduplexbildung verwendet und wie beschrieben (vgl. 2.13) mit 0.02 A_{260nm} des obigen 20mer mutagenisiert. Nach Vereinzelung von M13-Plaques auf JM105 Zellen wurde die RF-DNA von Einzelklonen mit EcoRI auf die durch Mutagenese eingeführte zusätzliche EcoRI-Schnittstelle (Ec_m) getestet. Diese konnte bei 4 aus 20 getesteten Klonen nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Aus Phagenpartikeln von Mutanten wurde ss-DNA isoliert und die Einführung der 3 gewünschten veränderten Basen mit M13-DNA-Sequenzierung (vgl. 2.10) bestätigt.

3.2.3 Überproduktion von IF3 in Stämmen mit mutierter Region des Startkodons von infC

Aus der RF-DNA von mutierten M13-Phagen mit den eingeführten Mutationen (vgl. Abb.9: B) wurde das Ec_1-HindIII-Fragment isoliert, indem die DNA mit HindIII linearisiert und die linearisierte DNA danach partiell mit EcoRI verdaut wurde. Die Bedingungen für den partiellen EcoRI-Verdau wurden empirisch mit einer Zeitkinetik für jede Enzympräparation von EcoRI neu ermittelt und lagen etwa bei 1 U EcoRI pro 5 µg DNA und einer Inkubationszeit von 1 Min. bei 37 °C. Das isolierte Ec_1-HindIII-Fragment wurde zur Konstruktion von pIM201 in gleicher Weise wie für pIM101 beschrieben in pPLc2833 kloniert, so daß sich pIM201 und pIM101 nur durch die eingeführten 3 veränderten Basen unterscheiden (vgl. Abb.9: A und B).

Zur Konstruktion von pIM202, dem entsprechenden Plasmid zu pIM102 (ohne rplT) mit dem mutierten infC Gen, wurde die RF-DNA zunächst mit NcoI linearisiert und anschließend mit

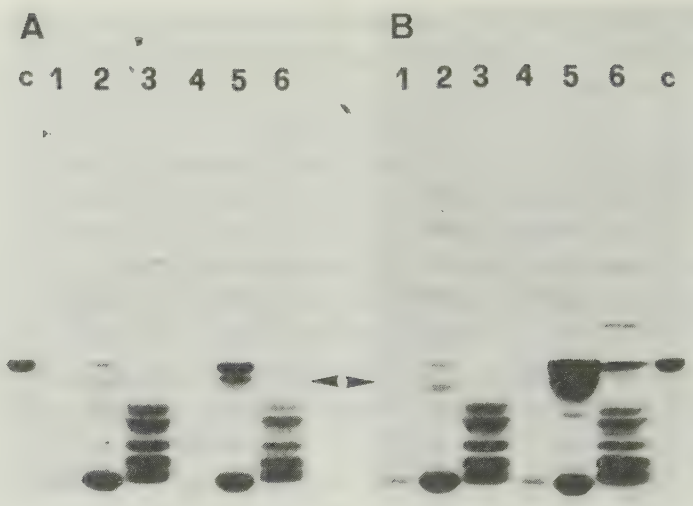

Abb.10 Gelanalyse der IF3 Expression in Stämmen mit mutiertem infC Gen. A: 1-6: K-12ΔH1Δtrp/pIM102; B: 1-6: K-12ΔH1Δtrp/pIM202;1-3: nicht induziert; 4-6: induziert; 1, 4: 0.3 M*; 2, 5: 0.5 M*; 3, 6: 1 M*; C: 2 µg IF3; * Ammoniumkonzentration der Waschlösung der P.-Cell. Säule; (vgl. Text).

EcoRI partiell verdaut. Das isolierte partielle Ec_1-NcoI-Fragment wurde wie für pIM102 beschrieben (vgl. 3.2.1) kloniert. In einer ersten halbquantitativen Gelanalyse wurde die Menge IF3 in Zellen mit pIM102 mit der in Zellen mit pIM202 verglichen (vgl. Abb.10). Es wurde gefunden, daß Stämme mit pIM202 nach Induktion IF3 etwa 10mal mehr IF3 produzierten als Stämme mit Wildtyp-infC im Plasmid (pIM102). Dabei wurde zusätzlich beobachtet, daß auch die Menge der in Zellen durch proteolytischen Abbau entstehenden kurzen Form von IF3 (Brauer und Wittmann-Liebold, 1977) stark zunahm (vgl. Abb.10; Pfeile und 3.2.7). Induzierte Zellen mit pIM202 zeigten verglichen mit induzierten Wildtyp Kontrollzellen (K-12ΔH1Δtrp/ pPLc2833) weder verändertes Wachstumsverhalten noch morphologische Veränderungen im Lichtmikroskop.

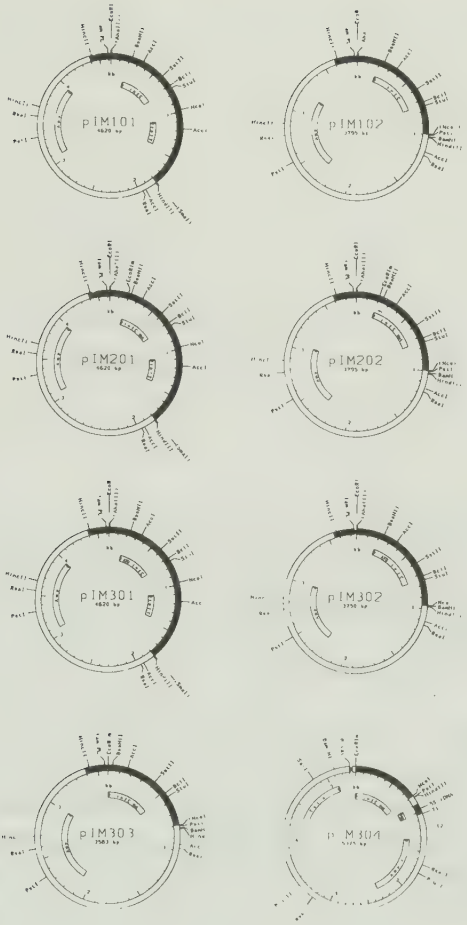

Abb.11 Kreisförmige Plasmidkarten von Plasmiden zur Überexpression von IF3. infC Mut: infC Gen mit ATG-Startkodon und AA→TC Austausch (vgl. Abb.9: B); ATG infC: infC Gen mit ATG-Startkodon (vgl. Abb.9: C); EcoRIm : Ec_m (vgl. Abb.9: B und Abb.12). Weitere Erläuterungen im Text.

Plasmid	Promotor	DNA-Sequenz	*rplT*
pIM101	λP_L	AAACAATTGGAGGAATAAGGTATTAAAGGC	+
pIM102	---	---	-
pIM201	λP_L	AAACAATTGGAGGAATTCGGTATGAAAGGC (Ec_m)	+
pIM202	---	---	-
pIM301	λP_L	AAACAATTGGAGGAATAAGGTATGAAAGGC	+
pIM302	---	---	-
pIM303	λP_L	AACGAAGCATTGGAATTCGGTATGAAAGGC (Ec_m)	-
pIM304	P_{tac}	TCACAGGAAACAGAATTCGGTATGAAAGGC (Ec_m)	-

Abb.12 Übersicht über die DNA-Sequenzen in der Startregion der Gene für IF3 auf Plasmiden. Kleine Buchstaben: identische Basen zu Wildtyp infC (pIM101, pIM102). Große Buchstaben: veränderte Basen; SD-Sequenz und Startkodone unterstrichen; Anwesenheit von rplT auf Plasmid wie angegeben (vgl. Abb.11). Weitere Erläuterungen im Text.

Mit der durchgeführten Mutagenese war ein Teilziel (die stabile Überproduktion von IF3) erreicht worden, jedoch stellte sich die Frage, ob dieser Effekt wegen der zusätzlichen Mutationen der eingeführten Ec_m-Schnittstelle (AA→TC) ausschließlich auf die Veränderung des Startkodons zurückgeführt werden konnte und ob weitere Steigerungen der IF3-Produktion zu erreichen waren. Deshalb sollte herausgefunden werden, welche Faktoren zu einer Erhöhung der IF3-Menge führen konnten. In einer systematischen Analyse sollte die Regulation der Expression, eine mögliche Beteiligung von rplT bzw. L20 hieran sowie der Einfluß der 3'-terminal des ATG gelegenen "leader"-Sequenz auf die Expression untersucht werden.

Zur Untersuchung des Einflusses der 192 bp 5'-terminalen Sequenz zwischen λ-Promotor und Startkodon des infC Gens

bzw. des generellen Einflusses der 5' des IF3-Startkodon gelegenen Sequenzen wurde diese Sequenz bei der Konstruktion von pIM303 deletiert (d.h. das $\underline{Ec}_1$-$\underline{Ec}_m$-Fragment wurde aus pIM202 entfernt). Hieraus entstand eine Fusionssequenz in pIM303 mit der Sequenz des Plasmidvektors 5'-terminal des ATG an der $\underline{Ec}_m$-Schnittstelle (vgl. Abb.12: Die 5'-terminale Sequenz wurde der Sequenz von pPLc28 aus Remaut et al. (1981) entnommen). Zusätzlich wurde das $\underline{Ec}_m$-PstI-Fragment aus pIM202 in pKK223-3 (Brosius und Holy, 1984) kloniert, wobei die $\underline{Ec}_m$-Schnittstelle mit der EcoRI-Schnittstelle des Vektors das mutierte ATG-Startkodon, mit der Shine-Dalgarno-(SD-)Sequenz des lacZ Gens fusionierte (vgl. Abb.12). Die entstandene Fusionssequenz (J. Brosius, persönliche Mitteilungen) trug die SD-Sequenz (vgl. Abb.11 und 12) 14 bp 5'-terminal des ATG-Startkodon und die Transkription des IF3-Gens stand nun unter der Kontrolle des induzierbaren tac-Promotors.

Zusätzlich zu diesen Plasmiden, in denen die gesamte 5'-terminale Sequenz verändert war, sollte nun untersucht werden, welchen Einfluß der AA→TC Austausch zwischen SD-Sequenz und Startkodon auf die Expression hatte.

Dazu wurde ein maschinell synthetisiertes und HPLC-gereinigtes (vgl. 2.11.5 und 2.12.2) Oligodeoxyribonukleotid (22mer) der Sequenz 5' **TTGGAGGAATAAGGTATGAAAG**-3' eingesetzt. Dieses 22mer wies zwei Fehlpaarungen zur pIM201 Sequenz (unterstrichen) auf (vgl. Abb.9: C), die die eingeführte EcoRI-Schnittstelle ($\underline{Ec}_m$) zur Wildtypsequenz "revertieren" sollten, wobei die Erkennungssequenz für das Enzym verloren ging. Unter Verwendung des obigen 22mer wurde eine vereinfachte Mutagenese nach der "gapped-duplex"-Methode durchgeführt: ss-DNA mit der pIM201-Sequenz wurde wie zuvor mit mit EcoRI und HindIII linearisierter mp18RF-DNA zur Bildung des Heteroduplex verwendet. Nach der Bindung des 22mer in die Einzelstranglücke wurde diese wie zuvor aufgefüllt und geschlossen. Zellen von BMH 71-18 mutS (vgl. Tab.1) wurden mit der Mischung transformiert und die transformierten Zel-

len über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen. Aus den Zellen wurde die RF-DNA isoliert, die eine Mischung aus RF-DNA mit der Ausgangssequenz und RF-DNA mit "revertierter" Ec_m-Schnittstelle enthielt. 5 µg dieser RF-DNA Mischung wurden mit EcoRI und HindIII verdaut und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Aus dem Gel wurde das 192 bp größere EcoRI-HindIII-Fragment isoliert, das aus RF-DNA mit "revertierter" Ec_m-Schnittstelle und ATG-Startkodon entstanden war. Durch Klonierung dieses Fragmentes in pPLc2833 wurde das Plasmid pIM301 erzeugt, das gegenüber der Sequenz des Wildtyp-infC nur die Veränderung ATT→ATG aufwies (vgl. Abb.12). In gleicher Weise, wie zuvor für pIM102 beschrieben, wurde aus pIM301 durch Reklonierung des EcoRI-NcoI-Fragmentes (d.h. Deletion von rplT) pIM302 erzeugt, wodurch die in Abb.11 mit den DNA-Sequenzen von Abb.12 konstruierten Plasmide entstanden.

Im folgenden sollte untersucht werden, welche Faktoren die in vivo gefundene erhöhte Expression des infC Gens bei den konstruierten unterschiedlichen Plasmiden beeinflußten. Die Aktivität des in Zellen angehäuften IF3-Proteins sollte dabei quantitativ bestimmt werden (vgl. 2.14.2) und zur Bestimmung des Einflusses der eingeführten Mutationen auf die Translationseffizienz mit a) der Kopienzahl der Plasmide und b) der Menge der infC-spezifischen mRNA in Zellen korreliert werden. Mit diesen nun vergleichbaren Plasmiden sollte es möglich sein, den vornehmlichen Grund für die bereits analytisch im Gel nachgewiesene Erhöhung der Menge an IF3 in Zellen (vgl. Abb.10) zu finden.

3.2.6 Bestimmung der Kopienzahl von Plasmiden mit infC Gen

Es war gezeigt worden, daß die Menge an IF3 in Stämmen mit zusätzlichen Kopien des Wildtyp-infC Gens in Plasmiden als Folge eines Gendosiseffektes erhöht ist (Lestienne et al., 1982). Daher war es notwendig, die Kopienzahl der ver-

Tabelle 6 Quantitative Analyse der Expression der klonierten IF3-Gene

	Stamm mit Plasmid	rplT Gen im Plasmid	relative Kopienzahl des Plasmides	relative Mengen von infC mRNA	relative Mengen von IF3 Protein
Exp. 1	pPLc2833	-	1.0	1.0	1.0
	pHW2	+	1.5	15.3	10.0
	pIM101	+	0.9	12.7	3.8
	pIM102	-	0.9	11.5	2.9
	pIM201	+	1.6	129 8	56.0
	pIM202	-	0.8	19.7	17.3
	pIM301	+	2.6	344.0	150 8
	pIM302	-	1.2	91.2	69.2
	pIM303	-	1.4	8.9	3.0
Exp. 2	Wt	-	nd	1.0	1.0
	pIM102	-	nd	5.6	10.5
	pIM202	-	nd	nd	26.0
	pIM303	-	nd	7.3	8.0
	pIM304[a)]	-	nd	nd	7.5
	pIM304[b)]	-	nd	58.9	102.5
	pIM304[c)]	-	nd	nd	36.5

a) Wachstum in Minimalmedium ohne Induktion (IPTG)
b) Wachstum in Minimalmedium mit Induktion
c) Wachstum in LB-Medium, Menge IF3 war mit und ohne Induktion gleich groß

schiedenen Plasmide mit den mutierten infC Genen zu bestimmen, um Einflüsse von Gendosiseffekten auf die Gesamtexpression bestimmen zu können. Die Kopienzahl wurde nur zum Zeitpunkt der Ernte der Zellen bestimmt, da nicht Schwankungen der Kopienzahl während der Wachstms- und Induktionsphasen interessierten, sondern die Anzahl der plasmidkodierten infC Genkopien während bzw. am Ende der Expressionsphase bestimmt werden sollte. Zum Vergleich der Plasmide untereinander wurde die Kopienzahl relativ zur vorhandenen Menge an Vektorplasmid bestimmt, wobei die Referenzzellen mit Vektorplasmid in gleicher Weise dem Induktionsvorgang (vgl. 2.6.8.6) unterzogen wurden. Die gefundenen Werte für die Plasmidkopienzahl (vgl. Tab.6) wurden somit relativ zur Kontrolle (Tab.6: Exp.1 pPLc2833) angegeben. Für die Bestimmung wurden 3 ver-

schiedene RNA/Plasmid-Konzentrationen (0.1, 0.15 und 0.25 A_{260nm}) für jedes Plasmid im Gel aufgetrennt (vgl. 2.6.16) Die Intensität jeder Bande wurde mit dem Laser-Scanner doppelt bestimmt. Als Endwert wurde der Mittelwert aus beiden Bestimmungen und über alle drei Konzentrationen ermittelt und zur ermittelten Menge an Vektorplasmid ins Verhältnis gesetzt. Beim Vergleich der gefundenen Werte fiel auf, daß mit Ausnahme von pIM101 (Wildtyp-*infC*) Plasmide mit *rplT* Gen 3'-terminal ("downstream") von *infC* auf dem Plasmid (pIM201 und pIM301) signifikant höhere Werte für die Kopienzahl aufwiesen. Alle anderen Werte lagen mit der gefundenen Schwankungsbreite von ±0.1 in Wiederholungsexperimenten annähernd im Bereich des Vektorplasmids (vgl. 4.5). Durch die Bestimmung der *infC*-spezifischen mRNA und der IF3-Aktivität in Zellen sollte nun ermittelt werden, wie diese Unterschiede bei der Gesamtexpression zu berücksichtigen waren.

3.2.6 Bestimmung der *infC*-spezifischen mRNA mit RNA-"dot-blot"-Hybridisierung

Aus 35 ml Zellkultur wurde die gesamte zelluläre RNA isoliert (vgl. 2.6.8.6 und 2.7.1), und die mit Glyoxalhydrat denaturierte RNA wurde in entsprechenden Verdünnungen an Nitrozellulosefilter gebunden (vgl. 2.7.2). Die Filter wurden mit 250-500 ng radioktiv markiertem *Acc*I-*Stu*I-Fragment (vgl. Abb.7: pIM1) des *infC* Gens hybridisiert (vgl. 2.8.2). Von den Filtern wurden Autoradiogramme angefertigt, und die an die Filter gebundene Radioaktivität wurde in einigen Fällen quantitativ bestimmt (vgl. 2.6.5). Hierbei wurden die beiden parallel aufgetropften RNA-Proben einer Konzentration gemeinsam gezählt.

Da die Größe der Filter für die Hybridisierung begrenzt werden mußte (siehe unten), konnten nicht alle mRNA-Proben aller konstruierten Plasmide und mit Proben von Zellen mit unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (induziert und nicht induziert) zusammen auf einem Filter analysiert werden. Da-

her wurden zunächst verschiedene Kombinationen von Extrakten aus verschiedenen Stämmen auf einem Filter zusammen hybridisiert.

Bei der Auswertung der Autoradiogramme (ohne Abbildung) wurde gefunden, welche Faktoren bei der Auswahl der Filter für die quantitative Bestimmung zu berücksichtigen waren:

a) Bei zu vielen Proben auf einem Filter (d.h. zu großen Filtern) traten Randeffekte auf, d.h. aufgetragene RNA-Proben an den Filterrändern banden höhere Mengen Radioaktivtät.

b) Die Proben mit der höchsten RNA-Menge (üblicherweise 2-5 µg RNA/µl; 8-20 µg RNA pro "spot") wichen mit deutlich niedrigeren Mengen an gebundener Radioaktivität von der Konzentrationsabhängigkeit ab.

c) Die an die Filter gebundene Radioaktivität war abhängig von der spezifischen Aktivität der radioaktiven DNA-Probe, dem Volumen der Hybridisierungslösung und der Anzahl der hierin hybridisierten Filter.

d) Bei Stämmen mit den Plasmiden pIM101 und pIM102 (Widtyp-infC) traten in verschiedenen Experimenten größere Schwankungen bei der Bestimmung der infC-mRNA auf als bei Stämmen mit den anderen Plasmiden.

Um Einflüsse der in a) und c) beschriebenen Unterschiede auf die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung gering zu halten, wurde die Anzahl der Proben auf einem Filter begrenzt, und die erhaltenen cpm-Werte für die gebundene Radioaktivität wurden relativ zu einer Kontrolle (RNA aus einen Stamm mit nur dem chromosomalen infC-Allel) bestimmt. Der in b) gefundene Effekt wurde dadurch ausgeglichen, daß Mittelwerte für die gebundene Radioaktivität gebildet wurden und nur cpm-Werte berücksichtigt wurden, bei denen die gebundene Radioaktivität proportional zur aufgetragenen RNA-Menge war (linearer Bereich). Das in d) beschriebene Verhalten von Stämmen mit pIM101 und pIM102 wurde in verschiedenen Experimenten unterschiedlich berücksichtigt, war aber für

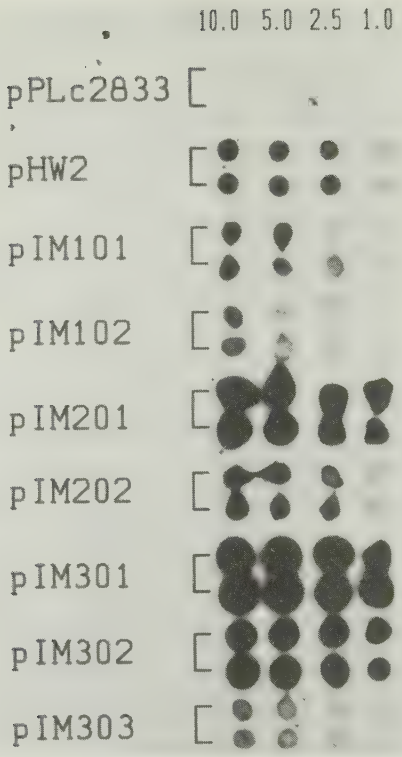

Abb.13 Autoradiogramm einer RNA-"dot-blot"-Hybridisierung. Die oberhalb angegebenen Werte entsprechen den aufgetropften RNA-Mengen in µg (in 4 µl Volumen ("spot"-Größe)). Die RNA wurde aus Stämmen mit den angegebenen Plasmiden isoliert und je Konzentration doppelt aufgetropft (vgl. Text).

die Gesamtaussage der quantitativen Untersuchungen nicht entscheidend (vgl. unten und 4.5).

Bei der Auswertung der Autoradiogramme der RNA-"dot-blot"-Analysen wurde gefunden, daß in Stämmen, die Plasmide mit allen getesteten infC Genen unter Transkriptionskontrolle des λP_L-Promotors enthielten, ohne Induktion gleiche mRNA Mengen nachgewiesen wurden wie in Stämmen mit nur einer

chromosomalem Kopie des Wildtyp-Allels. Der Promotor war also reprimiert (vgl. 3.2.2). In Zellen mit dem Plasmid pIM304 konnten bereits in AN-Medium ohne Zugabe von IPTG erhöhte Mengen von infC-mRNA nachgewiesen werden (vgl. Tab.6: pIM304[a]). Die Menge an infC-mRNA war zudem in LB-Medium mit und ohne IPTG stark erhöht, was die weitere Verwendung des tac-Promotors in JM103 Rezipientenzellen einschränkte, jedoch ein wichtiges Zusatzergebnis erbrachte (siehe unten).

Für die erste quantitative Bestimmung der infC-mRNA wurden zunächst die RNA-Proben von den Stämmen auf einem Filter zusammengefaßt, von denen (nach 3.2.5) die Plasmidkopienzahl bestimmt wurde (vgl. Tab.6, Exp.1). Die Bestimmung der mRNA-Menge, der IF3-Aktivität und der Plasmidkopienzahl erfolgte an Teilproben derselben 500 ml Kulturen für die aufgeführten Stämme (vgl. Tab.6, Exp.1). Dabei wurden Stämme mit Plasmiden mit λP_L-Promotor induziert, während Zellen mit pHW2 wie zuvor beschrieben (vgl. 2.6.8.6) behandelt wurden. Von den 500 ml Kulturen wurden dabei 2 ml für die Bestimmung der Plasmidkopienzahl und 35 ml für die Isolierung der gesamten zellulären RNA verwendet. Die restlichen Zellen wurden für die Bestimmung der IF3-Aktivität eingesetzt. Die Abbildung 13 zeigt das Autoradiogramm des für die quantitative Bestimmung (Tab.6, Exp.1) verwendeten Filters nach 16 Std. Expositionszeit. Da auch bei anderen Autoradiogrammen deutlich wurde, daß bei den aufgetropften Proben häufig Schwankungen in der Verteilung und der Ausbreitung des RNA-Materials auf den Filtern (vgl. Abb.13, pIM101: 2.5 µg RNA) auftraten, wurden doppelte Proben für eine Konzentration aufgetropft, und die Radioaktivität beider Proben wurde gemeinsam bestimmt. Hierdurch wurde auch die ungleiche Verteilung der Radioaktivität (vgl. Abb.13, pIM202: 1.0 µg und pIM303: 5.0 µg) ausgeglichen. So wurde erreicht, daß die ermittelten Zählausbeuten mit den aufgetropften RNA-Konzentrationen korrelierten. In gleicher Weise wurden in einer weiteren Bestimmung der mRNA-Mengen

die Einflüsse des Promotors und/oder verschiedener "leader"-Sequenzen (vgl. Abb.12) auf die angesammelte infC-mRNA Menge bestimmt (Tab.6, Exp.2), wobei für pIM304 verschiedene Wachstumsbedingungen berücksichtigt wurden. Als Wildtyp-Kontrolle (Wt) wurde in diesem Experiment K-12ΔH1Δtrp ohne Plasmid verwendet, da bei diesen Stämmen die Plasmidkopienzahl wegen der Verwendung unterschiedlicher Plasmidvektoren und Induktionsmethoden (vgl. 3.2.4 und Abb.11) nicht bestimmt wurde. Die RNA-Proben dieses Wildtyprezipienten wurden wie in Exp.1 als interner Vergleichswert für die quantitative Bestimmung verwendet; d.h. die anderen Zählausbeuten sind relativ zu den für diese Kontrolle ermittelten angegeben. Die auf diesen Filter erneut bestimmten Werte für pIM102 und pIM303 konnten direkt mit Experiment 1 verglichen werden. Die absoluten Werte für die Kontrollen betrugen 532 cpm für pPLc2833 (Exp.1) und 512 cpm für Wt (Exp.2). Abschließend ließen sich aus den infC-mRNA Bestimmungen folgende Ergebnisse zusammenfassen:

1) Aus dem Vergleich der Werte für pIM102, pIM202 und pIM302 wurde geschlossenen, daß die eingeführten Mutationen dazu führten, daß in Zellen größere Mengen von infC-mRNA angesammelt wurden.

2) Die Anwesenheit von rplT "downstream" von infC auf Plasmiden (pIM101, pIM201 und pIM301) führte zu einer Verstärkung dieses Effektes, wobei zu berücksichtigen war, daß die Anhäufung erhöhter Mengen mRNA von einer Erhöhung der Plasmidkopienzahl (vgl. 3.2.4) überlagert wurde (vgl. 4.5).

3) Das Entfernen der "leader"-Sequenz führte bei pIM303 zu einer relativen Verringerung der Menge an infC-mRNA. Dieser Effekt wurde durch Veränderung der "leader"-Sequenz in pIM304 (Abb.10) und/oder Verwendung des "stärkeren" tac-Promotor für die Transkription ausgeglichen.

Mit der folgenden quantitativen Bestimmung der IF3-Aktivität sollte ermittelt werden, wie sich die untersuchten Faktoren

auf die Menge an aktivem IF3-Protein in Zellen auswirkten.

3.2.7 Bestimmung der IF3-Aktivität in Stämmen mit Plasmiden mit erhöhter infC Expression

Aus 450 ml Kulturen wurden wie beschrieben die S-100-Überstände (1 M NH_4Cl Waschlösung der Ribosomen) gewonnen, und in entsprechenden Verdünnungen hiervon wurde die IF3-Aktivität direkt quantitativ bestimmt (vgl. 2.14.1 u. 2.14.2). Die ermittelten Aktivitäten wurden relativ zur IF3-Aktivität in induzierten Kontrollzellen (mit chromosomalem Wildtyp-Allel von infC) angegeben. In diesen Zellen betrug das Verhältnis von IF3 : Ribosomen 0.12 bzw. die Menge IF3 war etwa 0.2% des Gesamtproteins im S100-Überstand. Die gleichen Werte wurden für nicht induzierte plasmidtragende Zellen ermittelt, wodurch erneut quantitativ bestätigt wurde, daß der λP_L-Promotor vollständig reprimiert war (vgl. Abb.8b und 3.2.6). Zum Vergleich aller ermittelten IF3-Aktivitäten wurden diese in Tabelle 6 zusammengefaßt und relativ zur internen Kontrolle des Experiments angegeben (vgl. Tab.6). Die IF3-Aktivität wurde für alle Stämme mit den erzeugten genetischen Veränderungen bestimmt, da die Erhöhung der Gesamtexpression von infC das primäre Ziel der Untersuchungen war. Daher wurden zur Auffindung der Bedingungen für die größtmögliche IF3-Menge in Zellen auch verschiedene Wachstumsbedingungen getestet (vgl. z.B. pIM304[a)-c)], Tab.6). Wegen der dabei bei einigen Stämmen in Teilexperimenten beobachteten stärkeren Schwankungen (vgl. Tab.6 mRNA-Mengen und IF3-Aktivität für pIM102 in Exp.1 und Exp.2), deren Ursachen nicht völlig geklärt werden konnten, wurde versucht, quantitative Bestimmungen soweit möglich an Zellen derselben Kulturen durchzuführen (Tab.6, Exp.1). Teilaspekte, deren Ergebnisse nur semiquantitativ oder deren mRNA-Mengen anhand von Autoradiogrammen der "dot-blot"-Experimente beurteilt wurden, konnten in der Zusammenfassung der Ergebnisse (Tab.6; nd= nicht quantitativ durchgeführt) den-

noch berücksichtigt werden, da in jedem Fall aus oben genannten Gründen die IF3-Aktivität quantitativ bestimmt wurde. Deshalb ließen sich diese Versuche aufgrund der in anderen Experimenten gefundenen grundsätzlichen Zusammenhänge aller Faktoren bei der Genexpression für die folgende Gesamtaussage verwenden.

Aus dem Vergleich der bestimmten IF3-Aktivitäten ließ sich nachweisen:

1) Die Gesamtexpression des infC Gens; d.h. die Summe aus Transkriptions- und Translationseffekten, wurde auf der Stufe der Translation durch das Wildtyp AUU-Kodon begrenzt. Dies konnte insbesondere durch den Vergleich von mRNA-Mengen und IF3-Aktivitäten nachgewiesen werden. Betrachtete man die mRNA Mengen (vgl. Tab.6) von pIM102 : pIM202 : pIM302, ergab sich ein Verhältnis von 1 : 1.7 : 7.9 während für die IF3-Aktivitäten ein Verhältnis von 1 : 6.0 : 23.9 ermittelt wurde. Die Menge IF3, die von Zellen angesammelt wurde, stieg überproportional zur Menge der infC-mRNA an. In gleicher Weise ergaben sich für pIM101 : pIM201 : pIM301 mRNA-Verhältnisse von 1 : 10.2 : 27.1 und Verhältnisse für die ermittelte IF3-Aktivität von 1 : 14.7 : 39.7. Im günstigsten Fall ließ sich die Menge IF3 in Zellen bis zu 40fach steigern, wobei gezeigt wurde (vgl. Abb.10 DNA-Sequenzen von pIM101 und pIM301), daß diese Steigerung ausschließlich auf die primäre Umwandlung des Startkodons von AUU→AUG zurückzuführen war.

2) Die Anwesenheit des rplT Gens 3'-terminal ("downstream") der verschiedenen infC Gene (vgl. Abb.11) beeinflußte die Menge an erzeugtem IF3-Protein positiv, wobei dieser Effekt auf die größere Menge und/oder höhere Stabilität (vgl. 4.5) der infC-mRNA in Stämmen mit rplT Gen im Plasmid zurückgeführt werden konnte.

Es wurde mit Methoden der 2D-Gelelektrphorese (vgl. 2.9.2.2) untersucht, ob dieser Effekt auf

unterschiedliche Mengen von L20-Protein in Zellen zurückgeführt werden konnte. Jedoch war L20 auch bei Anwendung verschiedener Zellaufschluß- und Proteinextraktionsmethoden (J. Schnier und S. Thamm; persönliche Mitteilungen) in den verwendeten Stämmen schwierig nachzuweisen. In den meisten Fällen fehlte der Proteinfleck von L20 im 2D-Gel, oder er war nur äußerst schwach anfärbbar. Nur in einem Fall (beim Vergleich von pIM302 und pIM301) konnte eine etwa zweifach erhöhte Menge von L20 in Zellen mit pIM301 nachgewiesen werden (ohne Abbildung) (vgl. 4.6).

3) Die Deletion der infC "leader"-Sequenz mit der Shine-Dalgarno Sequenz (vgl. Abb.12; pIM303) bei vorhandenem AUG-Startkodon setzte die Menge an IF3 zwar herab (auf Wildtyp-Menge Tab.6 Exp.1 und etwas darunter Exp.2), aber ermöglichte dennoch eine etwa 3-8fache Erhöhung der IF3-Menge, verglichen mit Zellen mit chromosomalem Wildtypallel. Dieses Ergebnis ist für die Bewertung postulierter Modelle zur Regulation der IF3-Expression (vgl. 4.6) auf der Ebene der Translation von Bedeutung (Gold et al., 1984).

4) Die Fusion des ATG-infC Gens mit der Shine-Dalgarno Sequenz des lacZ Gens in pIM304 (vgl. Abb.11) und die Transkription des Gens vom tac-Promotor im Plasmid ermöglichten in LB-Medium (vgl. Tab.6; pIM304$^{c)}$) in JM103 die "konstitutive" Anhäufung großer Mengen IF3 in Zellen ohne nachweisbare Einflüsse auf das Wachstum der Zellen. Diese Tatsache war ebenfalls von Bedeutung für Aussagen über die Regulation der Expression des infC Gens, jedoch war die weitere Verwendung des tac-Promotors als induzierbares System für die Erzeugung von IF3 aus folgenden Gründen nicht möglich:

a) Der tac-Promotor war auch in Minimal A-Medium in JM103 Zellen nicht völlig reprimierbar (vgl.

Tab.6; pIM304[a]).

b) Die gemessene IF3-Aktivität bei Wachstum von JM103/pIM304 in LB-Medium und auch in Minimal-Medium (vgl. Tab.6) beruhte zu ca. 90% auf der in diesen Zellen hauptsächlich vorhandenen kurzen Form von IF3 (ohne Abbildung). Hierbei war zu berücksichtigen, daß die kurze Form von IF3 im angewendeten quantitativen Aktivitätstest nur etwa 60% der Aktivität der langen Form besitzt (C. Gualerzi, pers. Mitteilungen). Daraus konnte gefolgert werden, daß die in Zellen mit pIM304 erzeugte Menge IF3-Protein (kurze und lange Form zusammen genommen) tatsächlich noch erheblich höher war, als dies aus den Werten des Aktivitätstests ersichtlich war (vgl. 4.6).

Es konnte somit gezeigt werden, daß die Veränderung des Wildtyp AUU-Startkodons zum AUG-Startkodon bei den mutierten infC Genen und die Expression dieser Gene auf "multicopy" Plasmiden in E. coli Stämmen zusätzlich zum chromosomalen Wildtyp-Allel von infC die gendosisabhängige Anhäufung von infC-spezifischer mRNA auslöste. Die mutierte mRNA ermöglichte aufgrund ihrer besseren Translationseffizienz (über einen Zeitraum von 90 Min. nach Induktion) die Anhäufung der 40fachen Menge des normalen IF3-Proteingehaltes von Wildtyp-Zellen. Sowohl die Menge als auch der Zeitraum, indem diese Menge erzeugt wurde, zeigten, daß eine effektive Autoregulation auf der Ebene der Translation nicht wirksam war. Es konnte zudem gezeigt werden, daß die Anwesenheit des rplT Gens auf Plasmiden die Gesamtexpression von infC positiv beeinflußte, wobei Erhöhungen der Expression des rplT Gens (d.h. erhöhte Mengen von L20-Protein) nicht nachgewiesen werden konnten.

4 DISKUSSION

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Klonierung des IF2-Gens aus B. stearothermophilus und die Expression des Gens in E. coli Zellen beschrieben. Im zweiten Teil wurde die Konstruktion von Mutanten des E. coli infC Gens dargestellt, in denen IF3 in erheblich erhöhten Mengen und stabil erzeugt und mit denen grundsätzliche Erkenntnisse über Genexpression und Regulation des Gens gewonnen wurden. Im folgenden sollen die Ergebnisse der Untersuchungen kritisch betrachtet werden und mit Ergebnissen anderer Autoren verglichen werden.

4.1 Primärsequenz der IF2-Proteine und Sequenzhomologien für die DNA-Kreuzhybridisierung

Aus Untersuchungen von Kay et al. (1976) war bekannt, daß der thermophile Organismus B. stearothermophilus einem dem E. coli IF2 entsprechenden Proteinfaktor mit $M_r \simeq 82000$ besitzt, dessen Aktivität im Poly(AUG)-abhägigen fMet-tRNA-Bindungstest (Kay et al., 1976) sowohl mit 30 S Untereinheiten aus B. stearothermophilus als auch aus E. coli nachgewiesen werden kann.

Die bekannte DNA-Sequenz des E. coli infB Gens kodierte für zwei mögliche IF2-Proteine (IF2α und IF2β) desselben Leserasters (Plumbridge et al., 1985), die beide aus E. coli Zellen isoliert wurden. Da der aus B. stearothermophilus isolierte Faktor von der Größe her dem kleineren E. coli IF2β entsprach und aus Proteinhomologievergleichen (Sacerdot et al., 1984; March und Inouye, 1985) gesichert schien, daß auf dem entsprechenden DNA-Fragment des IF2β die GDP-bindende Domäne (Jurnak, 1985) des Proteins liegt, wurden die DNA-Fragmente für die Kreuzhybridisierung innerhalb dieses Genbereichs gewählt (vgl. 3.1). Die bekannten Homologien für die DNA- und Proteinregionen GDP-bindender Proteine ließen

eine gute Kreuzhybridisierung mit chromosomaler DNA aus B. stearothermophilus erwarten, jedoch wurden zunächst Hybridisierungsbedingungen mit 25% Formamid gewählt, die nicht stringent waren (Mosely und Falkow, 1980), da in jedem Fall eine Kreuzhybridisierung erzielt werden sollte. Die für die Hybridisierung verwendeten DNA-Fragmente des E. coli infB wurden so ausgewählt, daß diese einfach (d.h möglichst mit singulär im Plasmid schneidenden Restriktionsenzymen) zu isolieren waren, und sie enthielten mit Ausnahme des 5'-terminalen XhoI-HindIII-Fragmentes nur DNA-Sequenzen des Strukturgens. Bei den zunächst gewählten nicht stringenten Hybridisierungsbedingungen trat starke unspezifische Hybridisierung mit chromosomalem DNA-Banden der B. stearothermophilus DNA mit höheren Molekulargewichten auf, so daß diese wie von Mosely und Falkow vorgeschlagen, durch Erhöhung der Formamidkonzentration optimiert wurden (Brombach et al., 1986). Bei den optimalen Hybridisierungsbedingungen mit 40% Formamid zeigte das SstI-SmaI-Fragment des infB Gens mit dem größten Teil der DNA der vermutlichen GDP-Bindungsstelle wie erwartet die stärkste Kreuzhybridisierung (vgl. 3.1.2) und wurde zunächst als primäres Fragment für die Identifizierung der Gensequenzen aus B. stearothermophilus eingesetzt.

Nach Identifizierung des spezifischen HindIII-Fragmentes (vgl. 3.1.3) wurden dann erneut die anderen DNA-Fragmente des infB Gens eingesetzt, um zum einen eine zusätzliche Kontrolle zu bekommen, daß die gesamte entsprechende DNA-Region kloniert wurde, und zum anderen herauszufinden, wo und in welcher Orientierung das Gen auf dem klonierten Fragment lag. Da dennoch bis zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen war, daß die identifizierte DNA-Region nicht für das heterologe Protein kodierte ("Hybridisierungsartefakt"), wurde hierdurch zusätzlich der Bereich für die vermutliche Lage des Gens auf dem klonierten DNA-Fragment begrenzt.

Dies erleichterte die Bestätigung des richtigen DNA-Fragmentes durch DNA-Sequenzierung, und es gelang, mit dem ersten DNA-Sequenzierungsgel das mögliche für das Protein

kodierende Leseraster zu identifizieren. Bei der weiteren Sequenzierung wurde die Sequenzierungsstrategie im wesentlichen nach den technischen Möglichkeiten der verwendeten Sequenzierungseinheit (LKB-Macrophor) ausgerichtet (vgl. 3.1.4). Bei einer durchschnittlichen Länge einer gelesenen Sequenz aus einer Sequenzierungsreaktion von 300-400 bp (vgl. Abb.2b) konnte weitgehend auf Klonierungen nach der "Shot-gun"-Methode verzichtet werden. Die bei dem thermophilen Charakter des Organismus (Wachstumsoptimum 62 °C) zu erwartenden GC-reichen Bereiche der DNA (vgl. 3.1.4) erzeugten einige Sequenzkompressionen, die eine eindeutige Zuordnung der Basenabfolge erschwerten (d.h. das Bandenmuster zeigte im Sequenzierungsgel in diesen Bereichen bei 50 °C Lauftemperatur des Gels aufgrund von Sekundärstrukturen der DNA-Fragmente keine regelmäßigen Abstände). Die Sequenz konnte jedoch in allen Bereichen bei Erhöhung der Geltemperatur auf 68 °C während des Laufes abgesichert werden, da sekundäre Wechselwirkungen bei 8 M Harstoff im Gel und dieser Temperatur stark reduziert waren.

Mit Hilfe des Computerprogramms, das die Auffindung der Sequenzüberlappungen der Einzelgele erleichterte, wurde die Gesamtsequenz erzeugt, die zunächst von der HindIII-Schnittstelle (Position 133, Abb.3) bis zum TGA-Stopkodon (Position 2224, Abb.3) ein nach oben offenes Leseraster enthielt.

4.2 Festlegung des Proteinstarts für BstIF2 und Expression des Gens

Probleme traten zunächst bei der Auffindung des Proteinstarts ("ribosomale Bindestelle" (RBS)) für das vermutliche Protein auf.

Zum einen bestanden über die tatsächliche Größe des Proteins Unklarheiten, da bei der Reinigung des Faktors von Kay et al. (1976) auch IF2-Aktivitäten in der Größe von M_r = 113000 (S-IF-2α) und M_r= 56000 (S-IF-2β) beschrieben wurden.

Zum anderen wurden bei der Computer-unterstützten Suche

mit der bekannten Sequenz des 3'-Endes der 16 S rRNA ("anti-SD-Sequenz") (Hager und Rabinowitz, 1983) mehrere komplementäre Sequenzen (zwischen Pos. 133 und 480, Abb.3) gefunden, denen jedoch meist ein gewöhnliches Startkodon im üblichen Abstand fehlte (Hager und Rabinowitz, 1983). Somit blieb unklar, ob ein tatsächlicher möglicherweise "ungewöhnlicher" Translationsstart für das Protein in dieser Region lag.
Zur Klärung dieser Frage wurden daher folgende Wege gewählt:

1) Mit der von Pawlik et al. (1981) veröffentlichten Reinigungsmethode wurde aus Zellen von B. stearothermophilus 799 das IF2-Protein gereinigt. Aus diesen Zellen wurde nur ein IF2-Protein isoliert, dessen Reinheit durch Nachweis einer Bande im SDS-Gel (vgl. auch Abb.6: S) bestätigt wurde. Dieses Protein hatte nach seinen Laufeigenschaften im Gel eine Größe von $M_r \simeq 82000 \pm 1000$. Die N-terminale Aminosäuresequenz, die von diesem Protein ermittelt wurde, war in der Sequenz des offenen Leserasters nicht enthalten (vgl. 3.1.4).
2) Es gab Hinweise, daß Gene aus Gram-positiven Organismen mit hoher Wahrscheinlichkeit in E. coli Zellen exprimiert werden (Hager und Rabinowitz, 1983; Barker, 1982). Es war von uns daher beabsichtigt, auch das Gen für BstIF2 in E. coli Zellen zu exprimieren. Daher wurde versucht, mit dem bis zu diesem Zeitpunkt klonierten HindIII-SphI-Fragment einen in vivo Expressionstest durchzuführen (vgl. 3.1.4). Außerdem war abzusehen, daß das konstruierte Plasmid (pCML1) auch für die Konstruktion des Expressionsplasmids für das vollständige Gen verwendet werden könnte (vgl. Abb.4). Das gefundene Ergebnis, daß von dem klonierten Fragment in E. coli Zellen kein Protein exprimiert werden konnte, zeigte zum einen, daß die RBS für das vermutliche IF2-Protein nicht kloniert war. Zum anderen wurde auch nachgewiesen, daß innerhalb des nachher gefundenen vollständigen Leserasters mit hoher Wahrscheinlichkeit kein kleineres (dem EcoIF2β entsprechendes) Protein translatiert wird. Effi-

ziente ribosomale Bindestellen, die die früher nachgewiesene niedermolekulare IF2-Aktivität (siehe oben) erklären konnten, konnten von uns somit in vivo in E. coli Zellen nicht bestätigt werden. Diese Proteine waren daher vermutlich durch proteolytischen Abbau innerhalb der Zellen oder während der Reinigung der Proteine entstanden. Gleichartige Proteinfragmente traten zudem auch in vivo in E. coli Zellen auf, wenn diese große Mengen EcoIF2 und BstIF2 von geeigneten Expressionsvektoren erzeugen (unveröffentlichte Ergebnisse). Generell war jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt, ob in B. stearothermophilus nicht doch noch eine größere (α-Form) und eine kleinere β-Form vorlag. Es war nun wahrscheinlich, daß der für diese Proteine kodierende Genbereich noch nicht kloniert war, d.h. 5'-terminal der HindIII-Schnittstelle liegen mußte.

Das klonierte SstI-ClaI-Fragment wurde auch unter diesem Gesichtspunkt wegen seiner Größe ausgewählt, da ein möglicher Translationsstart für eine α-Form auf dem klonierten Fragment hätte liegen müssen. Der mögliche Translationsstart für den von uns aus B. stearothermophilus gereinigten Proteinfaktor konnte nach der weiteren Bestimmung der DNA-Sequenz (vgl. Abb.2b) anhand der guten Übereinstimmung mit der N-terminalen Aminosäuresequenz gefunden werden. Zudem lag oberhalb des ATG-Startkodon eine für Gram-positive Bakterien übliche ribosomale Bindestelle (Hager und Rabinowitz, 1983).

Induktionsversuche zeigten dann, daß in E. coli Zellen mit dem Plasmid pIM401 (vgl. Abb.5) ein Protein exprimiert wird, das im Molekulargewicht mit dem Protein übereinstimmt, welches aus B. stearothermophilus Zellen isoliert wurde (vgl. Abb.6). Da das Protein in erheblicher Menge in den Zellen erzeugt wurde, diese Zellen aber morphologisch und im Wachstumsverhalten keinerlei Veränderungen gegenüber gleichbehandelten Rezipientenzellen mit Vektorplasmid (pPLc2833) zeigten (unveröffentlichte Ergebnisse), kamen Zweifel an der

biologischen Aktivität des exprimierten Proteins auf. Daher wurde das Protein aus induzierten E. coli Zellen (pIM401) isoliert und gereinigt. Der anschließende Test der Aktivität des Proteins (vgl. Tab.2) wurde unter zwei Gesichtspunkten durchgeführt:

a) Der Nachweis der Aktivität des BstIF2 sollte mit Ribosomen aus E. coli und B. stearothermophilus möglich sein.
b) Die für EcoIF2 nachgewiesene Stimulierung der Aktivität durch IF1 (Gualerzi et al., 1986) sollte auch für BstIF2 untersucht werden.

Aus den Ergebnissen ging hervor, daß der in E. coli Zellen in großer Menge erzeugte Faktor aktiv war (vgl. Tab.2), jedoch waren einige Unterschiede zur Aktivität von EcoIF2 bemerkenswert:

1) Die Aktivität von BstIF2 mit 30 S Untereinheiten aus E. coli war deutlich höher als umgekehrt die von EcoIF2α mit 30 S Untereinheiten aus B. stearothermophilus, worin eine mögliche höhere Speciesspezifität des E. coli Faktors gesehen werden kann (siehe unten).
2) Die Aktivität von BstIF2 wurde deutlich weniger von IF1 aus E. coli stimuliert als die von EcoIF2. Die größere Stimulierung der Aktivität von EcoIF2 im heterologen System mit 30 S aus B. stearothermophilus bei Zugabe von IF1 zeigte dabei, daß dieser Unterschied nicht auf die Wechselwirkung von beiden Proteinen mit den Untereinheiten zurückzuführen war, sondern auf den direkten Einfluß von IF1 auf die IF2-Proteine. Dieses Ergebnis war somit in guter Übereinstimmung mit Aussagen, daß ein IF1-Protein bzw. dessen Aktivität in B. stearothermophilus nicht gefunden wurde (Kay et al., 1976).

Da nachgewiesen war, daß das klonierte Gen das Strukturgen für BstIF2 war und das aktive BstIF2-Protein in E. coli Zellen exprimiert wurde, war es von Interesse, die genetische Information insgesamt zu vergleichen.

4.3 Vergleichende Analyse der Sequenzdaten

Bei der vergleichenden Analyse der Sequenzdaten wurde zunächst die vermutete starke Homologie, die Voraussetzung für die gute gefundene Kreuzhybridisierung war, im Bereich der GTP-bindenden Region (vgl. Pos. 730 bis 1075, Abb.3) bestätigt. Dies zeigte eine generelle Möglichkeit auf, Gene für heterologe Proteine aus anderen Organismen mit DNA-Kreuzhybridisierung zu identifizieren, da davon ausgegangen werden kann, daß definierte funktionelle Domänen von Proteinen konserviert sind.

Die Grenzen dieser Methode werden jedoch deutlich, wenn man den Bereich des Proteins betrachtet, der dem anfangs für die Kreuzhybridisierung verwendeten XhoI-HindIII-Fragment entspricht (Pos. 1579 bis zum Ende des Gens, Abb.3), In diesem Bereich findet man ebenfalls relativ hohe Homologie zwischen beiden Proteinen, jedoch war die Kreuzhybridisierung bei Verwendung des entsprechenden DNA-Fragments erheblich schwächer. Dies zeigt, daß bei der Anwendung der Kreuzhybridisierungstechnik bei bekannten regionalen Homologien der Proteine nicht darauf vertraut werden kann, daß die entsprechenden DNA-Sequenzen auch optimale Hybridisierungsergebnisse erbringen.

Daher wurden von uns mehrere Teilfragmente des Strukturgens aus E. coli getrennt unter verschiedenen (empirisch ermittelten) Hybridisierungsbedingungen eingesetzt und die erhaltenen Bandenmuster miteinander verglichen (unveröffentlichte Ergebnisse). Dies lieferte zusätzliche Informationen über Anzahl und Lage der Gene im Genom des anderen Organismus, und es konnten zudem konservierte Restriktionsenzymschnittstellen im Gen bestimmt werden.

Die Verteilung der gesamten Homologie im Protein ergab die bereits angesprochene (vgl. 3.1.8) klare Trennung in die C-terminalen stark homologen Zweidrittel und das N-terminale zu E. coli nicht homologe Drittel. Diese Aussage trifft je-

doch vorwiegend auf den direkten parallelen Vergleich der Aminosäureprimärsequenzen zu. Wird nämlich der Charakter sowie die Aminosäurezusammensetzung der N-terminalen Teile verglichen, (stark basisch und hydrophil), findet man unter Berücksichtigung der sonstigen Unterschiede (vgl. 3.1.8) dennoch ähnliche Aminosäurezusammensetzungen in den N-terminalen Teilen beider Proteine.

Dies wird auch durch die Basenzusammensetzung der DNA in dieser Region unterstrichen. Die DNA dieser N-terminalen Region zeigte im Gegensatz zum anderen Teil des Gens zwei gut zu unterscheidende komplementäre Stränge. Der eine ("Purinstrang"; er ist 5'→3' in Abb.3 abgebildet) enthielt vornehmlich G und A während der andere ("Pyrimidinstrang") entsprechend C und T enthielt. Diese Basenverteilung ist auch im entsprechenden Teil des Gens aus E. coli vorhanden, und bei DNA-Homologievergleichen (UWGCG-software; Devereux et al., 1984) wurde zusätzlich bestätigt, daß das Gen für BstIF2 dem für EcoIF2β homolog ist. Es wurde in den DNA-Sequenzen nur signifikante Homologie zwischen dem 5'-terminalen Drittel des B. stearothermophilus Gens und dem Teil des E. coli Gens unterhalb des β-Startkodons gefunden, nicht aber mit der Sequenz oberhalb des β-Startkodons. Umgekehrt konnte ebenfalls keine signifikante Homologie gefunden werden, wenn die DNA-Sequenz, die der Sequenz des zusätzlichen α-Teiles in E. coli entspricht, mit der Sequenz oberhalb des Startkodon in B. stearothermophilus verglichen wurde.

Zusammenfassend ergibt sich somit, daß ein N-terminaler Bereich in beiden IF2-Proteinen in seiner Größe und in der Aminosäurezusammensetzung konserviert ist. Dieser könnte in beiden Organismen eine ähnliche Funktion haben, die jedoch wegen der starken Unterschiede in der Primär- und Sekundärstruktur möglicherweise speciesspezifische Unterschiede aufweist.

Da die Vorstellungen über die Funktion dieser Region des IF2-Proteins bisher von der besonderen Struktur der E. coli Faktoren ausgingen (Sacerdot et al., 1984), bieten

die Ergebnisse dieser Arbeit entscheidende Ansatzpunkte zur Überprüfung dieser Vorhersagen. So gab es Hinweise, daß die N-terminale Domäne von EcoIF2α mit der 16 S rRNA und der fMet-tRNA in Wechselwirkung steht (Sacerdot et al. 1984) und daß EcoIF2α im Gegensatz zu IF2β an DNA bindet (Gualerzi et al., 1986). Weiterhin gab es Hinweise, daß die DNA-bindende Aktivität des Faktors die Aktivität der RNA-Polymerase beeinflußt (Travers et al., 1980). Da nun aufgrund der vorliegenden Arbeit größere Mengen BstIF2 zur Verfügung stehen, kann geprüft werden, inwieweit ähnliche Funktionen auch für BstIF2 nachgewiesen werden können.

Weiterhin sind Untersuchungen möglich, ob an diesen Funktionen die N-terminale Domäne beteiligt ist. Ausgehend von den in Expressionsvektoren klonierten Genen beider Faktoren können mit genetischen Methoden Hybridproteine hergestellt werden, die die Proteinbereiche der E. coli Faktoren und des B. stearothermophilus Faktors in verschiedenen Kombinationen enthalten. Die detaillierte Untersuchung der Funktionen dieser Hybridproteine sollte eine Zuordnung von Funktionen zu Proteinbereichen ermöglichen.

Darüber hinaus unterstützen die vorliegenden Ergebnisse über BstIF2 bereits indirekt einige für die E. coli Faktoren entwickelten Vorstellungen zur Wirkungsweise von IF2. So gab es Hinweise, daß IF2 die Bindung der fMet-tRNA an 30 S Untereinheiten direkt an der 30 S Untereinheit fördert (Canonaco et al., 1986) und er nicht als fMet-tRNA-Überträger ("carrier") wirkt. Diese Vorstellung wird durch die vorliegenden Ergebnisse unterstützt, da der für die Wechselwirkung mit der fMet-tRNA postulierte N-terminale Teil in BstIF2 nicht konserviert ist (siehe oben). Die stimulierende Aktivität von BstIF2 kann aber sowohl mit 30 S Untereinheiten aus E. coli als aus B. stearothermophilus nachgewiesen werden (vgl Tab.2). Dennoch schließt die Tatsache, daß im N-terminalen Bereich der Proteine keine Homologie gefunden wird, nicht aus, daß dieser Bereich an der fMet-tRNA Bindung beteiligt ist, da auch Sequenzhomologien mit der Methionyl-

tRNA Synthetase (sie bindet fMet-tRNA für die Beladung mit der Aminosäure) weder für die E. coli Faktoren (Sacerdot et al., 1984) noch BstIF2 (unveröffentlichte Ergebnisse) nachgewiesen werden können.

Dies könnte bedeuten, daß die Wechselwirkung der tRNA mit IF2 komplexere Strukturen erfordert als die Wechselwirkung mit Guanosinnukleotiden und daher keiner klar definierten Domäne im Protein zugeordnet werden kann. Sollte der nicht homologe N-terminale Teil dennoch an der tRNA-Bindung beteiligt sein, könnte dies damit erklärt werden, daß IF2 die fMet-tRNA Bindung an der 30 S Untereinheit fördert (Gualerzi et al., 1986). Wahrscheinlicher scheint jedoch zu sein, daß die tRNA-Bindestelle im homologen Zweidrittel der Proteine liegt, worauf auch Untersuchungen von Pon et al. (1986) hindeuten, bei denen gezeigt wurde, daß Proteinfragmente dieses Teils im wesentlichen alle Funktionen des gesamten Faktors besitzen.

4.4 Verwendung des Triplettkodes in B. stearothermophilus

Die Verwendung des Triplettkodes in dem untersuchten Gen wurde unter dem Gesichtspunkt betrachtet, ob die genetische Information erkennen läßt, daß das klonierte Gen Gram-positiven und moderat thermophilen Ursprungs ist. Hierzu wurde bereits die Kodonbenutzung mit der des entsprechenden Gens aus E. coli verglichen (vgl. 3.1.8), wobei Hinweise auf möglicherweise speciesspezifische Unterschiede gewonnen wurden. Hier soll diskutiert werden, inwieweit die gefundenen Unterschiede für die genetische Information von anderen Genen desselben Bakteriums oder ähnlicher Organismen zutreffen.

Die Information über charakteristische Merkmale der Gene in Gram-positiven Bakterien ist am umfangreichsten und am besten für die bekannten Gene aus B. subtilis (Hager und Rabinowitz, 1984) zusammengefaßt. Hieraus wurde bereits deutlich, daß das identifizierte IF2-Gen charakteristische Merkmale dieser Bakteriengruppe besitzt (ΔG-Wert der SD-

Wechselwirkung und weniger präferenzielle Kodonbenutzung) (vgl. 3.1.5).

Für den Vergleich mit anderen Genen derselben Bakterienart steht bisher nur die Information des Gens für die Tyrosyl-tRNA Synthetase (TyrTS) aus B. sterarothermophilus zur Verfügung (Winter et al., 1983), und es ist fraglich, ob die bisher gefundenen Unterschiede bei der Benutzung des Triplettkodes als typisch für moderat thermophile Organismen anzusehen sind. Insbesondere wurde von diesen Autoren für das untersuchte Gen ein erhöhter G+C-Gesamtgehalt im Vergleich mit dem entsprechenden Gen aus E. coli nachgewiesen, der für das von uns untersuchte IF2-Gen mit 54% (E. coli IF2β : 53.8%) nicht signifikant höher lag.

Generell ist anzuzweifeln, ob der G+C-Gesamtgehalt einer gefundenen DNA-Sequenz beim Vergleich dieser beiden Bakterienspecies verwendet werden sollte, da der für das E. coli Genom gefundene Wert für den G+C-Gehalt mit 48-52% nicht significant über dem von B. steraothermophilus mit 51.9% liegt (Holt et al., 1984; Holt und Krieg, 1986).

Dennoch unterstreicht z.B. die Kodonbenutzung für die Aminosäuren Arginin, Alanin und Glycin im BstIF2-Gen eine andere von diesen Autoren als "thermophile Gen-Eigenschaft" bezeichnete Tendenz zur preferenziellen Benutzung von Kodonen mit höherem Anteil an G-C Basenpaaren (vgl. Tab.4). Da diese Tendenz für das IF2-Gen aus B. stearothermophilus nur durch eine 10%ige Erhöhung der Verwendung von G in der dritten Position im Triplett ausgeprägt ist (vgl. Tab.5), dieser Effekt jedoch verglichen mit dem Gen aus E. coli durch den verringerten Anteil von G in der ersten und zweiten Position im Triplett und einem insgesamt geringeren Anteil von C in allen Positionen des Tripletts kompensiert wird, führt dies zu dem insgesamt nicht signifikant höheren G+C Gesamtgehalt des B. stearothermophilus Gens.

Betrachtet man die Möglichkeiten des genetischen Kodes, so geht ohnehin hervor, daß Erhöhungen des G+C-Gehalts in Strukturgenen mit Ausnahme für die Aminosäure Leucin nur

durch Variationen in den beiden letzten Positionen der Tripletts erzeugt werden können. Daher erscheinen Betrachtungen von Sekeguchi et al. (1987) für die Beurteilung des "Thermophilie-Grads" von Genen interessant, die auch von Winter et al. (1983) für das TyrTS-Gen diskutiert wurden. Diese Autoren verglichen bei drei Genen für die 3-Isopropylmalat Dehydrogenase aus B. coaggulans (fakultativ thermophil), B. caldotenax (obligat moderat thermophil) und Thermus thermophilus (extrem thermophil) nicht nur den G+C-Gesamtgehalt der Gene, sondern sie verwendeten insbesondere den G+C-Gehalt der dritten Position im Triplett (der mit der größten Variationsmöglichkeit) für die Klassifizierung des "Thermophilie-Grads", da dieser stärker mit der optimalen Wachstumstemperatur des jeweiligen Organismus korrelierte. Wird dieser Gesichtspunkt auf die IF2-Gene angewendet, ergibt sich für B. stearothermophilus ein Wert von 66.3% (E. coli IF2β : 54.1%) für den G+C-Gehalt der 3. Position im Triplett, wobei der für BstIF2 gefundene Wert noch über dem Wert von 65.2% für das von den obengenannten Autoren verglichene Gen aus B. caldotenax liegt. Wendet man also dieses Kriterium auf die Kodonbenutzung an, läßt sich dies gut mit der Klassifizierung von B. sterarothermophilus als obligat moderat thermophil korrelieren. Zusätzlich wird dies durch den vergleichbaren Wert von 68.1% G+C in der 3. Position des Triplets für das TyrTS-Gen aus B. stearothermophilus unterstrichen.

4.5 Expression von infC in Stämmen mit zusätzlichen extrachromosomalen Kopien des Gens auf Plasmiden

Aus den in der Aufgabenstellung (vgl. 1.4) erwähnten Gründen sollte die Optimierung der Expression des infC Gens wie folgt erreicht werden:

1) Die komplexe Operonstruktur der infC-Region mit zahlreichen Promotoren (Grunberg-Manago et al., 1984)

sollte mit der Subklonierung des Strukturgens für IF3 größtmöglich vereinfacht werden.

2) Die Transkription des Gens von starken Promotoren sollte maximale Mengen infC-mRNA in Zellen erzeugen, was Voraussetzung für die Erzeugung von großen Mengen IF3-Protein sind.

Diese Bedingungen wurden mit der Konstruktion von pIM101 erfüllt. Es zeigte sich jedoch, daß die Mengen an IF3 in Stämmen mit diesem Plasmid niedriger waren als in Stämmen mit dem Plasmid pHW2 (vgl. 3.2.2.).

Als Gründe für dieses unerwartete Ergebnis wurden verschiedene regulatorische Effekte in Betracht gezogen (vgl. 3.2.2). Nach dem Kenntnisstand aller durchgeführten Untersuchungen ist hierfür aber vor allem die geringe Stabilität der durch die Subklonierung erzeugten "künstlichen" infC-mRNA des Wildtyp-Gens verantwortlich. Die geringe Stabilität dieser mRNA kann auch erklären, warum bei der Bestimmung der mRNA-Mengen für die Plasmide pIM101 und pIM102 die größten experimentellen Schwankungen beobachtet wurden (siehe unten).

Setzt man voraus, daß für alle konstruierten Plasmide mit λP_L-Promotor (pIM101 bis pIM303) durch die Verwendung desselben Vektor/Promotor-Systems die Syntheserate der infC-mRNA annähernd gleich hoch ist, läßt sich die gefundene Verbesserung der Expression am besten mit Erhöhungen bzw. Verringerungen der Stabilität der infC-mRNA als Folge der vorgenommenen Veränderungen erklären; d.h. die gefundene Anhäufung der infC-mRNA in Stämmen mit mutiertem infC auf Plasmiden ist die Folge des reduzierten Abbaus der mRNA.

Aus einer Veröffentlichung von King et al. (1986) geht hervor, daß in E. coli mRNA vornehmlich durch 3'→5' Exonukleasen abgebaut wird, wobei längere mRNAs durch Endonukleasen in spezifische Fragmente zerlegt werden. Die Erkennung der Endonukleaseschnittstellen wird dabei durch die Sekundärstruktur der mRNA beeinflußt. Weiterhin ist bei

der in E. coli vorhandenen Kopplung von Transkription und Translation eine hohe Translationsaktivität einer mRNA ein wirksamer Schutz vor nukleolytischen Abbau.

Dies kann somit die erhebliche Erhöhung der infC-mRNA Menge in Stämmen mit ATG-infC erklären, da die mRNA durch ihre erhöhte Translationseffizienz vor Abbau geschützt wird. Hieraus kann auch gefolgert werden, daß die beiden zusätzlich mutierten Basen der Ec_m-Schnittstelle in pIM201/202 (vgl. Tab.5) einen negativen Effekt auf die Translationseffizienz ausüben, da die angehäufte infC-mRNA Menge in Stämmen mit diesen Plasmiden geringer ist (vgl. Tab.6 und Abb.13).

Vereinfacht lassen sich auf diese Weise auch die annähernd gleichhohen Mengen infC-mRNA in Stämmen mit pIM101/102 und pIM303 erklären, wenn man annimmt, daß die RBS von pIM101/102 mit "idealer" SD-Sequenz und ineffizientem ATT-Startkodon gleich effektiv ist wie die von pIM303 (kaum erkennbare SD-Sequenz und ATG-Startkodon) (vgl. Tab.5). Daß der gesamte Expressionsvorgang komplexer ist, zeigt jedoch der Vergleich der IF3-Aktivitäten in Stämmen mit diesen Plasmiden. Während in Exp.1 (Tab.6) bei relativ hohen Werten für infC-mRNA Mengen bei pIM102 und pIM303 geringe IF3-Aktivitäten ermittelt wurden, scheint dies in Exp.2 (Tab.6) annähernd umgekehrt zu sein.

Für diese Unterschiede können vor allem zwei Gründe angeführt werden. Zum einen ist die angewendete Bestimmungsmethode der mRNA-Menge insbesondere für wenig effektiv translatierte und damit schnell abgebaute mRNAs zu ungenau. Dies wurde durch die stärkeren experimentellen Schwankungen bei den mRNA-Mengen für die obengenannten Plasmide bestätigt. Zum anderen erlaubte die Bestimmungsmethode der IF3-Aktivität keine Unterscheidung zwischen dem Anteil der kurzen und langen Form von IF3 an der Aktivität im S100-Überstand (vgl. 3.2.7).

Es wurde zwar generell gefunden, daß die Menge an kurzer IF3-Form proportional zur IF3-Gesamtmenge in Zellen anstieg,

jedoch wurden insbesondere bei geringen IF3-Mengen in Zellen stärkere Schwankungen des Verhältnisses von kurzer zu langer Form in verschiedenen Experimenten beobachtet. Die Gründe hierfür konnten nicht geklärt werden; es gibt jedoch Hinweise, daß die Umwandlung von IF3 in die weniger aktive kurze Form eine Möglichkeit zur Regulation der IF3-Aktivität darstellt (C. Gualerzi, pers. Mitteil.).

Auf eine genaue Untersuchung dieser Effekte z.B. mit experimentell aufwendigen Bestimmungen von Halbwertszeiten und Syntheseraten der mRNA wurde jedoch verzichtet, da die durchgeführten Bestimmungen für die erwünschte Gesamtaussage ausreichten.

Überdies war die gefundene Korrelation in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen von Lestienne et al. (1982) über die Expression von infC vom Plasmid pB5-57. Für dieses zu pHW2 konstruktionsgleiche Plasmid (vgl. 3.2) war von den Autoren auch gefunden worden, daß die erhöhte Produktion von IF3 in Stämmen mit diesem Plasmid auf der gendosisabhängigen Expression des Gens und der hohen Stabilität der infC-mRNA beruht (Sacerdot et al., 1982).

Dieser für infC gefundene Gendosiseffekt bietet auch eine Erklärungsmöglichkeit für die zusätzliche Erhöhung der Menge infC-mRNA in Zellen mit rplT auf dem Plasmid, da insbesondere bei pIM201 und pIM301 auch die relative Plasmidkopienzahl erhöht war (vgl. Tab.6).

Eine Erklärung für diesen Effekt liefern Untersuchungen von Stueber und Bujard (1982). Sie zeigten, daß bei einer nicht terminierten starken Transkription auf Plasmiden das "Durchlesen" der RNA-Polymerase in die Region des Replikationsursprungs des Plasmids die Plasmidkopienzahl beeinflußt wird. Da das verwendete Vektorplasmid keine Transkriptionsterminatoren enthält (Remaut et al., 1981), erfolgte eine Termination auf den erzeugten Hybridplasmiden überwiegend an Terminatoren der insertierten DNA-Fragmente. Die in vivo gefundene Erhöhung der Kopienzahl von Plasmiden mit rplT

bestätigt somit *in vitro* Untersuchungen, die Hinweise darauf ergaben, daß der 3' zu *infC* gelegene Terminator t1 ineffizient terminiert, während die 3' zu *rplT* liegenden Terminatoren t2 und t3 effizient terminieren (Mayaux et al., 1983; Fayat et al., 1983). Zusätzlich ergaben diese Untersuchungen Hinweise auf eine mögliche *infC/rplT* polycistronische mRNA, was unter anderen auch der Grund war, weshalb ein Schwerpunkt dieser Arbeit die Untersuchung eines möglichen regulatorischen Einflusses von *rplT* (bzw. dessen Genproduktes L20) auf die *infC*-Expression war (vgl. 4.2).

Die Erklärung, daß die Terminatoren t2 und t3 die relative Kopienzahlerhöhung der Plasmide mit *rplT* hervorruft, weist aber auch einen Schwachpunkt auf. Sie kann nicht erklären, daß der Effekt für pIM101 und pIM102 nicht gefunden wurde und daß die Kopienzahl bei den Plasmiden mit *rplT* zudem in der Reihenfolge pIM101 < pIM201 < pIM301 deutlich anstieg.

Obwohl dieses Ergebnis nicht erklärt werden konnte, kann doch als gesichert gelten, daß dieser Gendosiseffekt bei Stämmen mit pIM201 und pIM301 für die nachgewiesene Erhöhung der *infC*-mRNA Mengen mitverantwortlich ist. Da dennoch auch eine Erhöhung der *infC*-mRNA Menge bei pIM101 im Vergleich zu pIM102 nachgewiesen wurde (vgl. Tab.6), mußte es noch einen zusätzlichen Effekt von *rplT* geben. Geht man einmal davon aus (obwohl dies experimentell hier nicht nachgewiesen wurde) daß alle Plasmide mit *rplT* das mögliche *infC/rplT*-Transkript tatsächlich erzeugen (vgl. 4.2) so sollte dieses Transkript dann aus den obengenannten Gründen (King et al., 1986) in *E. coli* Zellen langsamer abgebaut werden, da es sowohl am 3'-Ende um den *rplT*-Anteil verlängert ist und da es wegen der RBS von *rplT* durch zusätzliche translatierende Ribosomen vor Abbau geschützt wird. Somit sollte auch bei pIM101 im Vergleich mit pIM102 trotz gleicher Kopienzahl eine erhöhte IF3-Aktivität nachweisbar sein. Dies konnte tatsächlich gezeigt werden (vgl. Tab.6).

4.6 Transkriptionseinheit und Regulation des infC Gens

Wie aus der Aufgabenstellung hervorgeht, war das Hauptziel der Untersuchungen zur IF3-Expression die Maximierung der Expression von infC. Der hierfür eingeschlagene Weg durch Verwendung eines Plasmidvektors mit "Fremdpromotor" für die Transkription erlaubt daher nur begrenzte Aussagen über die Regulation der Expression von infC vorallem auf der Ebene der Translation.

Ein Beispiel einer solchen effektiven Regulation der Translation ist die sogenannte Autoregulation der Gene für ribosomale Proteine (Lindahl und Zengel, 1986). Dieses Regulationsmodell wurde hier für infC und rplT überprüft (vgl. 3.2.1).

Weiterhin sollte ein Modell für eine spezielle Regulation der Translation der infC-mRNA, das von Gold et al. (1984) für die Regulation der IF3-Expression postuliert wurde, überprüft werden.

Der beobachtete Gendosiseffekt für infC schien zunächst generell gegen eine Autoregulation, wie sie für ribosomale Proteine gefunden wurde, zu sprechen. Da jedoch dieser Gendosiseffekt bei den von uns untersuchten Plasmiden pHW0 und pHW2 nicht so ausgeprägt war (vgl. 3.2.1 und Abb.8a), wie von anderen Autoren beschrieben (Lestienne et al., 1982), wurde dies zum Anlaß genommen, diese Regulationsmöglichkeit erneut zu untersuchen. Von einer Reihe von Autoren wurde bisher nur eine Beteiligung von IF3 an der Regulation der Translation seiner eigenen mRNA diskutiert. Deshalb wurden Hinweise auf eine gekoppelte Transkription von infC und rplT zum Anlaß genommen, eine Beteiligung von rplT bzw. L20 an der Regulation der IF3-Expression zu untersuchen (Fayat et al., 1983; Sacerdot et al., 1982).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen lieferten zwar Hinweise, daß eine Hemmung der Translation der IF3-mRNA durch L20 unwahrscheinlich ist, jedoch

konnte eine Beteiligung von L20 an der Regulation nicht völlig ausgeschlossen werden. Hierzu werden folgende Begründungen genannt:

1) Die Deletion des rplT Gens auf Plasmiden führte bei keinem der erzeugten Plasmide zu einer erhöhten IF3-Aktivität in den Zellen (vgl. Tab.6).
2) Der nach neueren Untersuchungen nachgewiesene Effekt, daß die Abbaurate einer polycistronischen mRNA durch erhöhte Konzentrationen des Repressorproteins steigt (Cole und Nomura, 1986), konnte für eine mögliche infC/rplT-mRNA nicht nachgewiesen werden. Die Akkumulation der infC-mRNA war im Gegenteil sogar bei Plasmiden mit rplT stark erhöht (vgl. 4.1).
3) Es wurde in einem Fall eine Erhöhung der L20-Menge in Zellen mit Plasmiden mit rplT gefunden. Der Nachweis einer deutlichen Erhöhung für alle Plasmide mit rplT konnte jedoch nicht erbracht werden (vgl. 3.2.7, 2)). Hierfür sind vor allem experimentelle Schwierigkeiten zu nennen.

   So traten z.B. bei der Anpassung der Extraktionsmethode für die ribosomalen Proteine folgende Probleme auf. Ein eventuell erhöhter Anteil an L20 mußte im freien "Pool" der ribosomalen Proteine nachgewiesen werden. Daher wurden alle ribosomalen Proteine des gesamten Zellextraktes in gleicher Weise extrahiert, wie dies für die Extraktion der Proteine aus dem durch Ultrazentrifugation gewonnen Ribosomensediment (Isono et al., 1978) beschrieben wurde. Da dieser Proteinextrakt zudem wegen der vorgenommenen Hitzeinduktion des λ-Promotors zusätzliche zu den zellulären Proteasen noch die Proteasen des "heat-shock"-Systems in E. coli enthielt (Goff und Goldberg, 1985), war ein Abbau von Proteinen während der längeren Dialysezeiten der Proteinextrakte kaum vermeidbar. Eine Verkürzung der Dialysen war aber nicht

möglich, da dies zu drastischen Verschlechterungen der elektrophoretischen Auftrennung der ribosomalen Proteine führte, wodurch eine Identifizierung von L20 im 2D-Gel unmöglich wurde (ohne Abbildung). Dies führte vermutlich dazu , daß der Proteinfleck von L20 im 2D-Gel meist kaum zusehen war.

Zusätzlich wurde die Vermutung, daß ein Nachweis von L20 durch proteolytischen Abbau des Proteins beeinträchtigt wurde, durch andere Hinweise bestätigt. Hiernach gab es Hinweise, daß bei Hitzeschockbehandlung von E. coli Zellen vor allem Proteine der großen ribosomalen Untereinheit (L-Proteine) im freien zellulären "Pool" proteolytisch abgebaut werden (J. Schnier, pers. Mitteil.).

Bemerkenswert ist es in diesem Zusammenhang, daß die Erhöhung der L20-Menge für Zellen mit pIM301 nachgewiesen wurde, da das von diesen Plasmid erzeugte mRNA-Transkript die höchste Translationseffizienz bezüglich der mutierten RBS von infC hatte. Folglich könnte die Erhöhung der L20 Menge als eine Art "polarer Effekt" der mutierten mRNA gesehen werden. Danach wäre es vorstellbar, daß die Ribosomen als Folge der erhöhten Translationsrate von infC vermehrt, z.B. durch Reinitiation (Hershey, 1987), eine Erhöhung der Menge an L20-Protein bewirken. Dies kann als Hinweis auf die tatsächliche Existenz des infC/rplT-Transkripts gewertet werden. Hieraus kann nicht abgeleitet werden, daß L20 nicht seine eigene Expression "autoreguliert", da diese spezielle mutierte mRNA nicht in Wildtyp E. coli Zellen vorkommt.

Die erbrachten Hinweise auf mögliche Transkripte müssen dabei in Zusammenhang mit der erneuten Diskussion über die Operonstruktur der infC-Region gesehen werden, um sie in ein mögliches Regulationsmodell einbeziehen zu können.

In guter Übereinstimmung mit der hier vorgeschlagenen Interpretation der Ergebnisse sind dabei Untersuchungen von Wu et al. (1984). Diese Autoren zeigten, daß in vitro der Terminator t1 3' von infC nicht aktiv ist, und sie wiesen

nach, daß Transkripte in erheblichen Mengen von einem Promotor p1 innerhalb von infC erzeugt werden. Diese Transkripte enden an den Terminatoren t2 und t3 3' von rplT. Weiterhin fanden die Autoren (in vitro) keine Aktivität der für die infC Transkription postulierten Promotoren pO und pO' 5'-terminal von infC. Da gleichzeitig für infC aktive Promotoren 5'-terminal von thrS nachgewiesen wurden, wird von diesen Autoren postuliert, daß infC zusammen mit thrS transkribiert wird.

Im Gegensatz hierzu weisen Pramanik et al. (1986) erneut mit in vitro und in vivo Untersuchungen die Aktivität des Promotors pO' für die Transkription von infC nach. Diese Autoren verwenden im in vitro Transkriptionssystem jedoch DNA-Fragmente, die innerhalb von infC enden. Leider liefern diese Ergebnisse keinen Anhaltspunkt für die Länge der gefundenen infC-Transkripte.

Unter Umgehung dieser Problematik diskutieren Gold et al. (1984) ein Modell, das eine Regulation der IF3-Expression ausschließlich bei der Translation der infC-mRNA ermöglicht, wobei dieses Modell auch die gefundene Wachstumsanpassung der IF3-Konzentration (vgl. 1.4) erklären könnte. Danach enthält die infC-mRNA im Bereich der RBS mehrere zur 16S-rRNA komplementäre Bereiche. Diese Bereiche der 16S-rRNA sollen in der Region der mRNA-Bindestelle der 30S ribosomalen Untereinheit so angeordnet sein, daß sie die Bindung der infC-mRNA stabilisieren und eine IF3-unabhängige Translation der infC-mRNA (im Gegensatz zu allen anderen natürlichen mRNAs) ermöglichen. Weiterhin gewährleistet das ATT-Startkodon der infC-mRNA mit seiner geringen Komplementarität zum Antikodon der Initiator-tRNA eine hohe Diffusionsrate der infC-mRNA von 30S Untereinheiten, wobei es aber gerade noch effizient genug ist, um eine genügend hohe IF3-unabhängige Translationsrate zu ermöglichen. Da zusätzlich postuliert wird, daß IF3 mit der Bindung seiner eigenen mRNA an 30S Untereinheiten konkurriert, wird die IF3-Konzentra-

tion wie folgt reguliert: Sinkt die relative IF3-Konzentration an 30S Untereinheiten (z.B bei Steigerung des Wachstums durch Erhöhung der Ribosomensynthese), steigt die Translation der infC-mRNA, da diese von IF3 unabhängig ist. Im umgekehrten Fall wird bei zu hoher IF3-Konzentration die infC-mRNA aus der Bindung an 30S Untereinheit durch IF3 verdrängt. Zusätzlich werden wegen der hohen IF3-Konzentration alle anderen natürlichen (IF3-abhängigen) mRNAs bevorzugt translatiert, wodurch die Konzentration des Faktors sinkt.

In guter Übereinstimmung mit diesem Modell wird in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß das ATT-Startkodon tatsächlich in vivo die Expression limitiert. Dennoch scheinen Zweifel an der Gültigkeit des genannten Modells angebracht, da es auch den beobachteten Gendosiseffekt nicht erklärt. Weiterhin sollte die Steigerung der IF3-Menge von pIM301 nach diesem Modell erheblich geringer ausfallen, da die großen Mengen an IF3 auch mit der mRNA von diesem Plasmid um die Bindung an 30S Untereinheiten konkurieren sollten. Dies könnte nur erklärt werden, wenn man postuliert, daß der gesamte Regulationsmechanismus durch die Punktmutation völlig außer Kraft gesetzt wird, was nicht sehr wahrscheinlich ist.

Obwohl die Ergebnisse aus neueren Untersuchungen zusätzliche Hinweise für diesen Regulationsmechanismus der IF3-Expression auf der Ebene der Translation erbringen (Butler et al., 1986b), stehen einige Interpretationen dieser Autoren im Widerspruch zu den in der vorliegenden Arbeit erbrachten Ergebnissen.

So werden von diesen Autoren sogenannte "infC$^-$"-Mutanten zur Untersuchung der Regulation verwendet, deren phänotypische Ausprägung der Mutation in einem Fall (infC19-Mutante) darin besteht, daß in Zellen eine dreimal höhere IF3-Menge als in Wildtyp-Zellen gefunden wird. Dies wird auf einen Regulatiosdefekt zurückgeführt, der für den "ts$^-$"-Phänotyp der Mutante verantwortlich gemacht wird.

Im Gegensatz hierzu wird in dieser Arbeit gezeigt, daß Mutanten mit erheblich erhöhten IF3-Mengen (vgl. pIM304^b) in

Tab.6 Exp.2) keinerlei Phänotyp zeigen und normal wachsen. Obwohl von den Autoren in Komplementationsexperimenten nachgewiesen wurde, daß die Mutation im infC Gen liegt, fehlt eine genaue Charakterisierung der Mutanten auf molekularer Ebene. Die Erzeugung der Mutanten durch in vitro Behandlung größerer DNA-Bereiche mit Nitrosoguanidin und anschließende Integration der mutagenisierten DNA ins Chromosom durch homologe Rekombination macht es wahrscheinlich, daß die Mutanten mehrfache Mutationen enthalten könnten. Da von Wu et al. (1984) gezeigt wurde, daß innerhalb des infC Gens regulatorische Regionen für andere Gene (möglicher Promotor für L20) liegen, ist nicht auszuschließen, daß der Phänotyp der von Butler et al. (1986b) beschriebenen infC Mutanten durch polare Effekte hervorgerufen wird.

In diesem Zusammenhang sollte noch erwähnt werden, daß nach Abschluß der Untersuchungen für diese Arbeit von Wada und Sako (1987) Ergebnisse veröffentlicht wurden, wonach zwischen infC und rplT noch ein weiteres ribosomales Protein exprimiert wird.

Hieraus wird deutlich, daß die Diskussion über die Operonstruktur der infC Region keinesfalls abgeschlossen ist und weitere Untersuchungen zur Regulation der IF3-Expression unter Berücksichtigung dieser Tatsachen durchgeführt werden müssen.

Wichtige Voraussetzungen hierzu wurden mit den in dieser Arbeit erzeugten Mutanten erfüllt. Es sollte möglich sein, die definierten Mutationen, z.B. mit der Methode nach Gutterson und Koshland (1983) mit E. coli polA Stämmen, in das chromosomale Wildtyp-Allel von infC einzuführen. Die Untersuchung dieser Mutanten würde es ermöglichen, beobachtete Effekte den definierten, spezifischen Veränderungen zuzuordnen. Diese Methode scheint besser geeignet zu sein, nicht nur die offensichtlich komplexen Zusammenhänge der Regulation der infC-Expression aufzuklären, sondern auch die Funktion von IF3 zu untersuchen, da sie die Analyse von molekular gut charakterisierten Mutationen erlaubt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der erste Teil der Arbeit beschreibt die Identifizierung des Gens für den Initiationsfaktor IF2 aus dem moderat thermophilen Bakterium Bacillus stearothermophilus. Es wurde die gesamte DNA-Sequenz des Gens ermittelt, die für ein Protein vom Molekulargewicht M_r = 82043 kodierte. Weiterhin gelang es, das vollständige Gen aus zwei getrennt voneinander klonierten DNA-Fragmenten zusammenzufügen. In E. coli Zellen, die das Gen unter der Transkriptionskontrolle des λP_L-Promotors exprimierten, wurde das funktionell aktive IF2-Protein (BstIF2) in großen Mengen (ca. 0.8 mg BstIF2 pro g Zellfrischgewicht) erzeugt, wobei die Erzeugung des Proteins in diesen Mengen keine Auswirkungen auf das Wachstum und die Morphologie der Zellen hatte (Brombach et al., 1986).

Der zweite Teil beschreibt die Konstruktion von Mutanten des infC Gens aus Escherichia coli. Mit Methoden der stellenspezifischen Mutagenese mit Oligodesoxyribonukleotiden wurden Mutationen in der Region des Translationsstarts des Gens erzeugt. Dabei konnte gezeigt werden, daß sich die Expression des Gens um bis zu 40fach erhöht, wenn das ungewöhnliche ATT-Startkodon in ein gewöhnliches ATG-Startkodon umgewandelt wird. Unter der Transkriptionskontrolle des λP_L-Promotors und des tac-Promotors auf Expressionsplasmiden konnte das funktionell aktive IF3-Protein in E. coli Zellen exprimiert werden. Die Menge des erzeugten IF3-Proteins betrug dabei ca. 1 mg pro g Zellfrischgewicht. In Zellen des E. coli Stammes JM103 war dabei das mutierte Gen unter Transkriptionskontrolle des tac-Promotors in Vollmedium nicht reprimiert. Diese Zellen akkumulierten große Mengen des aktiven Proteins, ohne daß das Wachstum dieser Zellen verlangsamt war oder daß diese morphologische Veränderungen zeigten (Brombach und Pon, 1987).

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin
A_{260}	Absorption bei 260nm
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bidest.	doppelt destiliertes H_2O
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
C	Cytidin
^{14}C	Kohlenstoffisotop (Massenzahl 14)
Ci	Curie
cpm	counts per minute
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-trihosphat
ddATP	Didesoxyadenosin-5'-triphosphat
ddCTP	Didesoxycytidin-5'-triphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosin-5'-trophosphat
ddNTP(s)	Didesoxynukleotid-5'-triphosphat(e)
ddTTP	Didesoxythymidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP(s)	Desoxynukleotid-5'-triphosphat(e)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EF	Elongationsfaktor
g	Gramm
G	Guanosin
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
^{3}H	Wasserstoffisotop (Massenzahl 13) (Tritium)
IF1	Initiationsfaktor 1
IF2	Initiationsfaktor 2
IF3	Initiationsfaktor 3
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare

mA	Milliampere
M	molar
µ	mikro
Min.	Minute(n)
mRNA(s)	messenger Ribonukleinsäure(n)
n	nano
Na_2EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure Dinatriumsalz
p	Plasmid
^{32}P	Phosphorisotop (Massenzahl 32)
RF	replicative form
rRNA(s)	ribosomale Ribonukleinsäure(n)
RNase	Ribonuklease
Rt.	Raumtemperatur
Sek.	Sekunde
S	Svedbergeinheit
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	single strand
Std.	Stunden
T	Thymidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA(s)	transfer Ribonukleinsäure(n)
U	units (Enzymeinheiten); Uridin
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
X-gal	5-Bromo-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

LITERATURVERZEICHNIS

Barker, D.G. (1982) Cloning and amplified expression of the tyrosyl→tRNA synthetase genes of Bacillus stearothermophilus and Escherichia coli. Eur. J. Biochem. 125, 357-360.

Bernard, H.-U., Remaut, E., Hershfield, M.V., Das, H.K., Helinski, D.R., Yanofski, C. and Franklin, N. (1979) Construction of plasmid cloning vehicles that promote gene expression from bacteriophage lambda p_L promoter. Gene 5, 59-76.

Birnboim, H.D. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523.

Boileau, G., Butler, P., Hershey, J.W.B. and Traut, R.R. (1983) Direct cross-links between initiation factors 1,2, and 3 and ribosomal proteins promoted by 2-iminothiolane. Biochemistry 22, 3162-3170.

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Betlach, M.C. and Boyer, H.W. (1977) Construction and characterisation of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. Gene 2, 75-93.

Brauer, D. and Wittmann-Liebold, B. (1977) The primary structure of the initiation factor IF-3 from Escherichia coli. FEBS Lett. 79, 269-275.

Brombach, M., Gualerzi, C.O., Nakamura, Y. and Pon, C.L. (1986) Molecular cloning and sequence of the Bacillus stearothermophilus translational initiation factor IF2 gene. Mol. Gen. Genet. 205, 97-102.

Brombach, M. and Pon, C.L. (1987) The unusual translational initiation codon AUU limits the expression of the infC (initiation factor IF3) gene of Escherichia coli. Mol. Gen. Genet., in press.

Brosius, J. and Holy, A. (1984) Regulation of ribosomal RNA promoters with a synthetic lac operator. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81, 6929-6933.

Butler, J.C., Springer, M., Dondon, J., and Grunberg-Manago, M. (1986a) Posttranscriptional autoregulation of Escherichia coli threonyl tRNA synthetase expression in vivo. J. Bact. 165, 198-203.

Butler, J.C., Springer, M., Dondon, J., Graffe, M. and Grunberg-Manago, M. (1986b) Escherichia coli protein synthesis initiation factor IF3 controls its own gene expression at the translational level in vivo. J. Mol. Biol. 192, 767-780.

Canonaco, M.A., Calogero, R.A. and Gualerzi, C.O. (1986) Mechanism of translational initiation in procaryotes. Evidence for a direct effect of IF2 on the activity of the 30S ribosomal subunit. FEBS Lett. 207, 198-204.

Chang, A.C.Y., and Cohen, S.N. (1978) Construction and characterisation of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. J. Bacteriol. 134, 1141-1156.

Cole, J.R. and Nomura, M. (1986) Changes in the half-life of ribosomal protein messenger RNA caused by translational repression. J. Mol. Biol. 3, 383-392.

Coleman, J., Green, P.J. and Inouye, M. (1984) The use of RNAs complementary to specific mRNAs to regulate the expression of individual bacterial genes. Cell 37, 429-426.

Dahlberg, A. (1986) Site directed mutagenesis of E. coli rRNA. In: Structure function and genetics of ribosomes. B. Hardesty and G. Kramer (eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 686-698.

de Boer, H.P., Ng, P. and Hui, A. (1985) Synthesis of specialized ribosomes in E. coli . UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. New Ser. 30, 419-437.

Devereux, J., Haeberli, P. and Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucl. Acids Res. 12, 387-395.

Dunn, J.J., Buzash-Pollert, E. and Studier, F.W. (1978) Mutations of bacteriophage T7 that affect initiation of

synthesis of gene 0.3 protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2741-2745.

Elhardt, D., Wirth, R. and Böck, A. (1982) Regulation of formation of threonyl-tRNA synthetase, phenylalanyl-tRNA synthetase and protein synthesis initiation factor 3 from Escherichia coli in vivo and in vitro. Eur. J. Biochem. 123, 477-482.

Fayat, G., Mayaux, J.-F., Sacerdot, C., Fromant, M., Springer, M., Grunberg-Manago, M. and Blanquet, S. (1983) Escherichia coli phenylalanyl-tRNA synthetase operon region. Evidence for an attenuation mechanism. Identification of the gene for ribosomal protein L20. J. Mol. Biol. 171, 239-261.

Fritz, H.J., Belagaje, R., Brown, E., Jones, R., Lees, R. and Khorana, H. (1978) High pressure liquid chromatography in polynucleotide synthesis. Biochemistry 17, 1257-1267.

Geyl, D., Böck, A. and Isono, K. (1981) An improved method for two-dimensional gel-electrophoresis: Analysis of mutationally altered ribosomal proteins of Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 181, 309-312.

Girshovich, A.S., Bochkareva, E.S. and Pozdnyakov, V.A. (1974) Affinity labeling of functional centers of E. coli ribosomes. Acta Biol. Med. German. 33, 639-648.

Goff, S.A. and Goldberg, A.L. (1985) Production of abnormal proteins in E. coli stimulates transcription of lon and other heat shock genes. Cell 41, 587-595.

Gold, L., Pribnow, D., Schneider, T., Shinedling, S., Singer, B.S. and Stormo, G. (1981) Translational initiation in prokaryotes. Ann. Rev. Microbiol. 35, 365-403.

Gold, L., Stormo, G. and Saunders, R. (1984) Escherichia coli translational initiation factor IF3: A unique case of translational regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7061-7065.

Grunberg-Manago, M., Plumbridge, J.A., Sacerdot, C., Howe,

J.G., Springer, M., Hershey, J.B.W., Mayaux, J.F., Fayet, G. and Blaquet, S. (1984) The organisation and expression of genes for translational initiation factors. In: Gene Expression. B.F.C. Clark and H.U. Petersen (eds.), Munksgaard, Copenhagen, pp. 22-37.

Gualerzi, C.O., Pon, C.L., Pawlik, R.T., Canonaco, M.A., Paci, M. and Wintermeyer, W. (1986) Role of the initiation factors in Escherichia coli translational initiation. In: Structure, function, and genetics of ribosomes. B. Hardesty and G. Kramer (eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 621-641.

Gutterson, N.J. and Koshland, D.E., Jr. (1983) Replacement and amplification of bacterial genes with sequences altered in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4894-4898.

Hager, P.W. and Rabinowitz, J.C. (1985) Translational specificity in Bacillus subtilis. In: The molecular biology of the bacilli. D.A. Dubnau (ed.), Academic Press, Inc., London pp. 1-32.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J. Mol. Biol. 166, 557-580.

Hershey, J.B.W. (1987) Protein synthesis. In: Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and molecular biology. F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umbarger (eds.), Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, in press.

Holt, J.G. and Krieg, N.R. (1984) Bergey's Manual of systematic bacteriology, Vol.1, Williams & Wilkins, Balitimore/London.

Holt, J.G., Sneath, P.H.A, Mair, N.S. and Sharpe, M.E. (1986) Bergey's Manual of systematic bacteriology, Vol.2, Williams & Wilkins, Balitimore/London.

Howe, J.G. and Hershey, J.B.W. (1981) A sensitive immunoblotting method for measuring protein synthesis initiation factor levels in lysates of E. coli . J. Biol. Chem. 256, 12836-12839.

Howe, J.G. and Hershey, J.B.W (1984) The role of evolutonary divergence of initiation factors IF2 and IF3 in various bacterial species determined quantitatively by immunoblotting. Arch. Microbiol. 140, 187-192.

Inserentant, D. and Fiers, W. (1980) Secondary structure of mRNA and efficiency of translation initiation. Gene 9, 1-12.

Ishii, S., Ihara, M., Maekawa, T., Nakamura, Y., Uchida, H. and Imamoto, F. (1984) The nucleotide sequence of the cloned nusA gene and its flanking region of Escherichia coli. Nucl. Acids Res. 12, 3333-3342.

Isono, S., Isono, K. and Hirota, Y. (1978) Mutations affecting the structural genes and the genes coding for modifying enzymes for ribosomal proteins in Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 165, 15-20.

Isono, K. (1984) A computer program package for storing and retrieving DNA/RNA and protein sequence data. Nucl. Acids Res. 12, 101-112.

Jurnak, F. (1985) Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the amino acids homologous to ras oncogene proteins. Science 230, 32-36.

Kay, A.C., Graffe, M. and Grunberg-Manago, M. (1976) Purification and preparation of two initiation factors from Bacillus stearothermophilus. Biochimie 58, 183-199.

King, T.C., Sirdeskmukh, R. and Schlessinger, D. (1986) Nucleolytic processing of ribonucleic acid transcripts in procaryotes. Microbiol. Rev. 50, 428-451.

Kozak, M. (1983) Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. Microbiol. Rev. 47, 1-45.

Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H.-W., Kramer, B., Pflugfelder, M. and Fritz, H.-J. (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. Nucl. Acids Res. 12, 9441-9456.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Lederberg, J. and Lederberg, E.M. (1952) Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bacteriol. 63, 399-406.

Lestienne, P., Dondon, J., Plumbridge, J.A., Howe, J.G., Mayaux, J.-F., Springer, M., Blanquet, S., Hershey, J.W.B. and Grunberg-Manago, M. (1982) Expression of the gene for Escherichia coli initiation factor IF-3 in vivo and in vitro. Overproduction in recombinant-plasmid-bearing strains. Eur. J. Biochem. 123, 483-488.

Lindahl, L. and Zengel, J.M. (1986) Ribosomal genes in Escherichia coli. Ann. Rev. of Genet. 20, 297-326.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, I. (1982) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

March, P.E. and Inouye, M. (1985) GTP binding membrane protein of Escherichia coli with sequence homology to initiation factor 2 and elongation factors Tu and G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7500-7504.

Mayaux, J.-F., Fayat, G., Fromant, M., Springer, M., Grunberg-Manago. M. and Blanquet, S. (1983) Structural and transcriptional evidence for related thrS and infC expression. Proc. Natl. Acad. Sci USA 80, 6152-6156.

Messing, J., Crea, R. and Seeburg, P.H. (1981) A system for shotgun DNA sequencing. Nucl. Acids Res. 9, 303-321.

Messing, J. (1983) New M13 cloning vectors for cloning. Meth. Enzymol. 101, 20-78.

Moseley, S.L. and Falkow, S. (1980) Nucleotide sequence homology between the heat-labile enterotoxin gene of Escherichia coli and Vibrio cholerae deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 144, 444-446.

Nakamura, Y. and Mizusawa, S. (1985) In vivo evidence that the nusA and infB genes of E. coli are part of the same multi-gene operon which encodes at least four proteins. EMBO J. 4, 527-532.

Nakamura, Y., Plumbridge, J.A., Dondon, J. and Grunberg-Manago, M. (1985) Evidence for autoregulation of the

nusA-infB operon of Escherichia coli. Gene 36, 189-193.

Norrander, J., Kempe, T. and Messing, J. (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxyribonucleotide-directed mutagenesis. Gene 26, 101-106.

O'Farrell, P.H., Kutter, E. and Nakanishi, M. (1980) A restriction map of the bacteriophage T4 genome. Mol. Gen. Genet. 179, 421-435.

Pawlik, R.T., Littlechild, J., Pon, C. and Gualerzi, C. (1981) Purification and properties of Escherichia coli translational initiation factors. Biochem. Int. 2, 421-428.

Plumbridge, J.A., Springer, M., Graffe, M., Goursot, R. and Grunberg-Manago, M. (1980) Physical location and cloning of the structural gene for E. coli initiation factor IF3 from a group of genes concerned with translation. Gene 11, 33-42.

Plumbridge, J.A. and Springer, M. (1982) Escherichia coli phenylalanyl-tRNA synthetase operon: Characterisation of mutations isolated on multicopy plasmids. J. Bacteriol. 152, 650-660.

Plumbridge, J.A., Howe, J.G., Springer, M., Toutati-Schwartz, D., Hershey, J.W.B. and Grunberg-Manago, M. (1982) Cloning and mapping of a gene for translational initiation factor IF2 in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5033-5037.

Plumbridge, J.A., Deville, F., Sacerdot, C., Petersen, H.U., Cenatiempo, Y., Cozzone, A., Grunberg-Manago, M. and Hershey, J.W.B. (1985) Two translational initiation sites in the infB gene are used to express initiation factor IF2α and IF2β in Escherichia coli . EMBO J. 4, 223-229.

Pon, C.L. and Gualerzi, C. (1979) Quantitative and semi-quantitative assay of Escherichia coli translational initiation factor IF-3. Meth. Enzymol. 60, 230-239.

Pon, C. and Gualerzi, C. (1984) Mechanism of protein biosynthesis in prokaryotic cells. Effect of IF1 on the initial rate of 30S initiation complex formation. FEBS

Lett. 175, 203-207.

Pon, C.L., Wittmann-Liebold, B. and Gualerzi, C. (1979) Elucidation of the primary structure of IF1. FEBS Lett. 101, 157-160.

Pon, C.L., Pawlik, R.T. and Gualerzi, C.O. (1982) The topological localization of IF3 on E. coli 30S ribosomal subunits as a clue to its way of functioning. FEBS Lett. 137, 163-167.

Pon, C.L., Paci, M., Pawlik, R.T. and Gualerzi, C.O. (1985) Biochemical and biophysical characterisation of the interaction between IF2 and guanosine nucleotides. J. Biol. Chem. 260, 8918-8924.

Pramanik, A., Wertheimer, S.J., Schwartz, J.J. and Schwartz, J. (1986) Expression of Escherichia coli infC: Identification of a promoter in an upstream thrS coding sequence. J. Bacteriol. 168, 746-751.

Remaut, E., Stanssens, P. and Fiers, W. (1981) Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the P_L promoter of coliphage lambda. Gene 15, 81-93.

Remaut, E. Tsao, H. and Fiers, W. (1983) Improved plasmid vectors with a thermoinducible expression and temperature-regulated runaway replication. Gene 22, 103-113.

Sacerdot, C., Fayat, G., Dessen, P., Springer, M., Plumbridge, J.A., Grunberg-Manago, M. and Blanquet, S. (1982) Sequence of a 1.26-kb DNA fragment containing the structural gene for E. coli initiation factor IF3: presence of an AUU initiator codon. EMBO J. 1, 311-315.

Sacerdot, C., Dessen, P., Hershey, J.B.W., Plumbridge, J.A. and Grunberg-Manago, M. (1984) Sequence of the initiation factor IF2 gene: unusual protein features and homologies with elongationn factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7787-7791.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.

Sanger, F. Coulson, A.R., Barrell, B.G., Smith, A.J.H., and Roe, B.A. (1980) Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. J. Mol. Biol. 143, 161-178.

Schleich, T., Wikstrom, E., Twombly, K., Schmidt, B. and Tyson, R.W. (1980) Circular dichroism study of E. coli IF3 binding to nucleic acids. Biochemistry 19, 4486-4492.

Sekiguchi, T., Suda, M., Ishii,T. and Tsuda, K. (1987) The nucleotide sequence of 3-isopropylmalate dehydrogenase from Bacillus caldotenax. Nucl. Acids Res. 15, 853.

Smith, M.G. (1967) Isolation of high molecular weight DNA from normal and phage-infected Escherichia coli. Meth. Enzymol. 12, 545-550.

Steitz, J.A. (1969) Polypeptide chain initiation: nucleotide sequences of three ribosomal binding sites in bacteriophage R17 RNA. Nature 224, 957-964.

Steitz, J.A. and Jakes, K. (1975) How ribosomes select initator regions in mRNA: base pair formation between the 3' terminus of the 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein sythesis in E. coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4734-4738.

Springer, M., Graffe, M. and Grunberg-Manago, M. (1977a) Characterization of an E. coli mutant with a thermolabile initiation factor IF3 activity. Mol. Gen. Genet, 151, 17-26.

Springer. M., Graffe, M. and Hennecke, H. (1977b) Specialized transducing phage for initiation factor IF3 gene in E. coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3970-3974.

Sproat, B.S. and Gait, M.J. (1984) Solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides by the phosphotriester method. In: Oligonucleotide synthesis, a practical approach. M.J. Gait (ed.), IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 83-114.

Stueber, D. and Bujard, H. (1982) Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified

genes. EMBO J. 1, 1399-1404.

Thatch, R.E., Sundarajan, T.A., Dewey, K.F., Brown, J.C. and Doty, P. (1966) Translation of synthetic messenger RNA. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 85-97.

Thomas, P.S. (1983) Hybridisation of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose paper. Meth. Enzymol. 100, 255-266.

Travers, A.A., Debenham, P.G. and Pongs, O. (1980) Translational initiation factor 2 alters transcriptional selectivity of E. coli ribonucleic acid polymerase. Biochemistry 19, 1651-1656.

Tullis, R.H. and Rubin, H. (1980) Calcium protects DNaseI from proteinase K; a new method for removal of contaminating RNase from DNase I. Anal. Biochem. 107, 260-264.

van der Hofstad, G.A.J.M., Buitenhek, A., Bosch, L. and Voorma, H.O. (1978) IF3 and the binary complex between IF2 and fMet-tRNA are mutually exclusive on the 30S ribosomal subunit. Eur. J. Biochem. 89, 213-220.

Wada, A. and Sako, T. (1987) Primary structures of and genes for new ribosomal proteins A and B in Escherichia coli. J. Biochem. 101, 817-820.

Wikstrom, E. (1974) E. coli initiation factor IF3 binds to AUG and AUG-containing single strands and hairpin loops, and nonspecific binding to polymers. Biochim. Biophys. Acta 349, 125-130.

Wikstrom, E. (1981) Physical parameters of E. coli translational initiation factor binding to poly(A). FEBS Lett. 128, 154-156.

Winter, G., Koch, G.L.E., Hartley, B.S. and Barker, D.G. (1983) The amino acid sequence of the tyrosyl-tRNA synthetase from Bacillus stearothermophilus. Eur. J. Biochem. 132, 383-387.

Wittmann H.G. (1982) Components of bacterial ribosomes. Ann. Rev. Biochem. 51, 155-184.

Wittmann H.G. (1983) Architecture of prokaryotic ribosomes. Ann. Rev. Biochem. 52, 35-65.

Woo, N.H., Roe, B. and Rich, A. (1980) Three-dimensional structure of E. coli initiation $tRNA_f^{Met}$. Nature 286, 346-351.

Wu, T.-H., Wood, D.L., Stein, P.L. and Comer, M.M. (1984) Transcription of a gene cluster for two aminoacyl-tRNA synthetases and an initiation factor in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 173, 177-209.

Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33, 103-119.

Yonath, A., Saper, M.A., Makowski, I., Müssig, J., Piefke, J., Bartunik, H.D., Bartels, K.S. and Wittmann, H.G. (1986a) Characterisation of single crystals of the large ribosomal particles from Bacillus stearothermophilus. J. Mol. Biol. 4, 633-636.

Yonath, A., Saper, M.A. and Wittmann, H.G. (1986b) Studies on crystals of intact bacterial ribosomal particles. In: Structure, function, and genetics of ribosomes. B. Hardesty and G. Kramer (eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 112-127.

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.G. Wittmann für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seiner Abteilung und die Überlassung des Themas der Dissertation.

Für die unermüdliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der Arbeit an dieser Dissertation gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. C.O. Gualerzi und Frau Dr. C.L. Pon, die damit entscheidend zum Erfolg der Untersuchungen beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. V. Braun und Herrn Prof. Dr. K. Hantke für die freundliche Unterstützung meiner Promotion an der Universität Tübingen danken.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Gualerzi und der Abteilung Wittmann, die durch Hinweise und Ratschläge dazu beigetragen haben, mancherlei experimentelle Unwegsamkeiten zu überwinden und deren persönliche Unterstützung oftmals die Verarbeitung experimenteller Mißerfolge erleichterte.

A. Beck und den Mitarbeitern des gemeinsamen Rechenzentrums möchte ich für Ihre Unterstützung bei der Benutzung des Computers danken, deren Hilfe insbesondere die äußere Form der vorliegenden Dissertation beeinflußt hat.

LEBENSLAUF

Name, Vorname	:	Brombach, Martin
geboren am	:	8. August 1955
in	:	Rheine/Westfalen
Eltern	:	Ernst Brombach und Irma Brombach, geb. Saßmannshausen
Schulausbildung	:	1962–66 Volksschule Dahlbruch 1966–75 Fürst–Johann–Moritz Gymnasium, Siegen–Weidenau mathematisch–naturwissenschaftlicher Zweig Juni 1975 Allgemeine Hochschulreife
Wehrdienst	:	1975–77 Soldat auf Zeit (SAZ2)
Studium	:	1977–79 Grundstudium der Biologie an der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld Vordiplom: Juni 1979 1979–82 Hauptstudium der Biologie an der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen mit Hauptfachrichtung Mikrobiologie. September 1982 – August 1983 Diplomarbeit am Max–Planck–Institut für Molekulare Genetik in Berlin, Abteilung von Prof. Dr. H.G. Wittmann in der Arbeitsgruppe von Dr. K. Isono unter der Leitung von Prof. Dr. V. Braun, Tübingen. Diplom: August 1983 Januar 1984 – April 1987 Anfertigung einer Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. H.G. Wittmann in der Arbeitsgruppe von Dr. C.O. Gualerzi am Max–Planck–Institut für Molekulare Genetik, Berlin.

Meine akademischen Lehrer waren:

in Bielefeld:

P. Bergau, H.J. Bischof, P. Görner, K. Immelmann, A. Jost, W. Kowallik, W. Müller, C. Naumann, A. Reißland, H.G. Ruppel, P. v. Sengbusch, R. Sossinka, H. Tschesche

in Tübingen:

F.W. Bentrup, W. Bessler, V. Braun, H.-P. Fiedler, E. Fischer, H. Frank, J. Guglielmi, K. Hantke, K. Heller, V. Hemleben, J.-V. Höltje, D. Mecke, G.F. Meyer, C. Pelling, K. Poralla, H. Probst, E. Sander, H. Schwarz, H.U. Seitz, U. Seitz, W. Seyffert, H. Tichy, R. Werner, G. Winkelmann, K. Wöhrmann, H. Zähner

in Berlin:

C.O. Gualerzi, K. Isono, C.L. Pon, H.G. Wittmann.

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)